

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

INTOXICATION PAR L'AMANITE PHALLOÏDE. RÉACTIONS HUMORALES (1)

par le Professeur LÉON BINET et M^{lle} MICHÈLE LEBLANC.

Depuis quelques années, notre laboratoire s'est attaché à l'étude de l'intoxication par les champignons, étude biologique, expérimentale et thérapeutique. Avec l'assistance du D^r J. Marek, l'un de nous a décrit, en 1936, devant l'Académie des Sciences, au cours de l'intoxication phalloïdienne, l'existence d'une hypoglycémie s'accompagnant d'une légère chute du taux du sucre protéidique, d'une élévation de l'acide lactique et de l'indice chromique résiduel dans le sang ; l'importance de cette hypoglycémie a été confirmée, en 1944, à la suite d'expériences poursuivies avec R. Fabre et M^{lle} M. Marquis. Dès 1936, nous avons déduit de nos recherches biochimiques l'indication d'une thérapeutique sucrée qui a donné des résultats probants. L'intérêt du problème nous a semblé assez grand pour reprendre sur une échelle plus étendue des études biochimiques sur des animaux intoxiqués ; ce sont ces études qui feront l'objet du présent travail.

Nous avons expérimenté sur le lapin, animal sensible au poison phalloïdien même administré par voie buccale. Le choix du lapin présente de nombreux avantages : les uns sont d'ordre théorique, nos expériences deviennent comparables à celles des

(1) Nous tenons à remercier le professeur R. Combes et le professeur R. Heim qui ont bien voulu nous confier de nombreux spécimens d'Amanite phalloïde et à souligner l'intérêt de l'ouvrage de R. Dujarric de la Rivière sur le poison des Amanites mortelles.

expérimentateurs antérieurs qui presque tous ont utilisé cet animal ; les autres sont d'ordre pratique, le lapin est un animal de manipulation facile, les phénomènes gastro-intestinaux sont nuls ; il est en outre possible de suivre jour après jour l'intoxication, car la quantité de sang prélevée quotidiennement à la veine marginale de l'oreille permet d'effectuer une série de dosages impossibles à réaliser avec le rat ou la souris.

Nous avons utilisé une alcoolature du champignon toxique préparée en prenant le champignon dans son ensemble, à savoir : pieds et chapeaux ; des champignons entiers ont été lavés, essuyés au papier filtre, coupés en morceaux et mis à macérer, pendant un mois, dans un poids égal d'alcool à 95° ; le mélange agité, exprimé et filtré a été conservé à la température du laboratoire.

Nous avons adopté, pour l'administration de l'alcoolature, la voie sous-cutanée : des quantités déterminées de poison (dilué au moment de l'emploi à volume convenable avec de l'eau distillée stérilisée) ont été injectées sous la peau du dos, préalablement rasée, puis nettoyée à l'alcool.

Le sang destiné aux examens a été recueilli goutte à goutte par piqûre de la veine marginale de l'oreille du lapin. Chaque prise de sang était d'environ 20 cm³.



Nous avons étudié, chez l'animal injecté, les incidences possibles sur le métabolisme des glucides par le dosage de la glycémie, de l'indice chromique résiduel et du glycogène hépatique et musculaire ; sur le métabolisme azoté par le dosage de l'urée sanguine et du glutathion (sang et tissus) ; sur le métabolisme des lipides par le dosage du cholestérol sanguin ; sur le métabolisme minéral par le dosage du chlore plasmatique et globulaire ; et enfin sur la réserve du sang en bicarbonates par le dosage de la réserve alcaline.

Les techniques chimiques employées pour les différents dosages effectués ont été, pour la glycémie, la microméthode au ferri-cyanure de Hagedorn et Jensen ; pour l'indice chromique résiduel, la méthode de Polonovski et Warembourg ; pour le glycogène, la méthode de Pfluger modifiée ; le dosage de l'urée a été effectué par la méthode d'Allen et Luck, mise au point par Cuny et Robert ; la réserve alcaline a été déterminée suivant la méthode de Van Slyke ; la mesure du pH a été réalisée au moyen d'un potentiomètre à électrode de verre ; le taux du chlore sanguin a été déterminé par la méthode de Laudat adaptée par Lévy, les résultats ont été exprimés en chlore p. 1 000 ; le cholestérol total a été dosé par la méthode de Grigaut ; le dosage du glutathion a été effectué par la méthode de Binet et Wellers, basée

sur la précipitation élective du glutathion par le lactate de cadmium.

★★

Nos recherches ont porté sur l'examen *systématique* de 31 lapins, dont 2 témoins, et de 8 lapins spécialement *réservés* pour l'étude de la glycémie avant et après l'intoxication phalloïdienne (soit un ensemble de 39 lapins). Ces animaux ont été soumis à un régime d'alimentation normale : carottes, choux, betteraves, graines, foin, suivant la saison ; de l'eau a toujours été mise à leur disposition.

Le but de nos recherches étant avant tout l'étude du *syndrome humoral de l'empoisonnement phalloïdien*, nous avons examiné les effets de l'alcoolature sur des animaux pour lesquels l'injection de toxine n'a pas entraîné la mort et sur d'autres pour lesquels la dose inoculée a été mortelle. Nous avons classé nos observations en 3 groupes correspondant respectivement à la survie, à une évolution vers la mort lente ou à une évolution vers la mort rapide. Nous allons exposer ce que deviennent dans ces 3 cas la glycémie, l'indice chromique résiduel, le glycogène hépatique et musculaire, l'urée, la réserve alcaline, le chlore plasmatique et globulaire, le cholestérol sanguin et le glutathion du sang et des tissus.

A. — Les 7 lapins, qui ont *survécu* à l'injection d'alcoolature d'Amanite phalloïde, ont été sacrifiés dix à quarante-huit jours après l'inoculation, afin de rendre possible l'étude des taux de glutathion et de glycogène aux différentes étapes de l'expérimentation.

Nous n'avons pas noté chez ces animaux de chute de glucose sanguin. Un fait intéressant à signaler est l'installation chez 4 survivants d'une hyperglycémie passagère (2,68 g, 1,85 g, 1,54 g, 1,52 g p. 1 000) ; cette élévation de la glycémie est apparue tardivement, cinq à dix jours après l'inoculation du poison phalloïdien.

L'indice chromique résiduel a subi une augmentation qui, comme la glycémie, a été inconstante, tardive et de courte durée.

Le taux du glycogène hépatique a diminué chez 2 lapins sur 5, celui du glycogène musculaire chez 4 animaux sur 5.

Nous avons noté, dans quelques cas, une faible augmentation de l'urée sanguine (0,77 g, 0,70 g, 0,66 g p. 1 000).

Le chlore sanguin et la réserve alcaline ont subi, dans l'ensemble, peu de modifications, tandis que le taux du glutathion oxydé des tissus a légèrement augmenté.

Par contre, tous les survivants ont présenté une *hypercholestérolémie* (2,37 g, 1,60 g, 1,54 g, 1,32 g, 1,19 g, 0,80 g, 0,77 g p. 1 000) dès le lendemain ou le surlendemain de l'injection ;

l'augmentation a été progressive et rapide ; le retour à la normale, en général assez brusque, s'est produit dix à trente jours après l'inoculation (nous rappelons que, chez un lapin normal, le taux du cholestérol sanguin est en moyenne de 0,40 g p. 1 000, le minimum est de 0,20, le maximum de 0,60). Cette hypercholestérolémie s'est manifestée avant l'hypercholestérolémie de saignée décrite par P. Mauriac et que nous avons vérifiée sur 2 lapins normaux qui nous ont servi de témoins par rapport aux survivants. Ces derniers animaux ont été soumis au même régime que les animaux d'expérience. Nous avons adopté le même mode de prélèvement de sang, recueilli des quantités égales de sang et effectué le même nombre de prises. L'hypercholestérolémie présentée par les animaux témoins a été beaucoup plus lente à se manifester et a atteint un taux moins élevé que dans le cas des animaux soumis à l'intoxication phalloïdienne. L'hypercholestérolémie constitue un phénomène secondaire de l'intoxication puisque, d'une part, quelques animaux meurent sans manifester une augmentation du cholestérol sanguin et que, d'autre part, la manifestation de ce phénomène n'est pas suivie de mort.

B. -- Tout autre est le syndrome humoral présenté par les animaux qui sont *morts trois et quatre jours* après l'injection. Ce groupe ne comprend que 2 lapins, malgré tous les efforts tentés pour en accroître l'effectif.

Le taux du glucose sanguin n'a pas semblé considérablement perturbé.

L'indice chromique résiduel a légèrement augmenté ; il est à remarquer que de faibles variations de la glycémie ont été accompagnées de faibles variations, mais en sens inverse, de l'indice chromique résiduel.

Les modifications les plus caractéristiques ont été l'augmentation importante de l'urée sanguine (2,58 g, 1,40 g p. 1 000), augmentation brusque qui s'est manifestée tardivement le jour de la mort des animaux.

Contrairement à l'azotémie, le taux du chlore sanguin s'est abaissé progressivement. La baisse du chlore plasmatique a atteint 20 p. 100 de la valeur initiale, celle du chlore globulaire 30 à 35 p. 100. Le rapport érythroplasmatisque a donc diminué.

La réserve alcaline a subi une élévation tardive.

L'étude du taux du cholestérol montre que l'hypercholestérolémie est un phénomène dont l'apparition nécessite un temps de latence, car les deux lapins morts lentement ont présenté une élévation de leur teneur du sang en cholestérol (1,81 g, 1,30 g p. 1 000), tandis que cette élévation a été inconstante chez les animaux morts rapidement.

Le glutathion sanguin, et en particulier le glutathion oxydé, a augmenté.

Le groupe de la mort lente est donc caractérisé par l'azotémie progressive et intense avec chute du chlore sanguin.

C. — Les animaux qui ont présenté une *mort rapide* ont succombé entre vingt-quatre et quarante-huit heures, après l'injection d'alcoolature. Sur 20 lapins, 13 ont présenté une *hypoglycémie*, 7 autres sont morts la nuit et nous n'avons pu vérifier leur taux de glucose sanguin. La chute de la glycémie a été tardive, survenant dans les heures qui précèdent la mort ; elle a été accentuée et a abouti à des chiffres de 0,60 à 0,20 g p. 1 000. Cette chute du taux du glucose sanguin n'est jamais apparue au début de

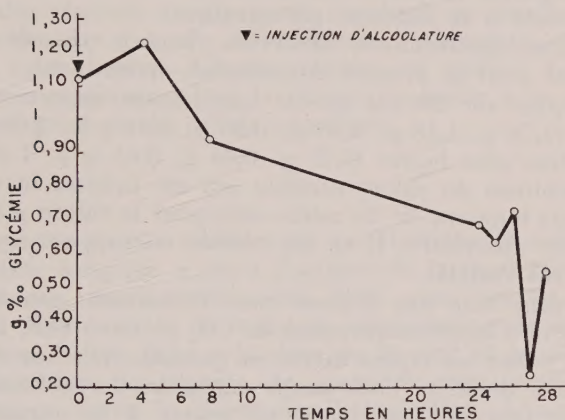


FIG. 1. — Variations du taux du glucose sanguin après injection d'alcoolature d'Amanite phalloïde chez un lapin qui évolue rapidement vers la mort.

l'intoxication, période pendant laquelle l'animal semblait normal ; elle s'est installée brusquement et a précédé l'apparition des accidents ; elle n'a jamais été accompagnée de glycosurie. L'hypoglycémie s'est chaque fois manifestée objectivement par des convulsions caractéristiques (mouvement de pédale des pattes, sursauts brusques, bonds désordonnés) alternant avec un état de prostration, d'abattement, chute de la tête, écartement des pattes antérieures en croix.

Chez les 8 lapins examinés du seul point de vue de la glycémie, le sang a été prélevé plusieurs fois par jour. Dans plusieurs cas, la glycémie, après être tombée à un taux très faible, a subi une légère remontée immédiatement suivie de mort. Les résultats montrent que l'hypoglycémie constitue un phénomène constant dans le cas des lapins morts rapidement (fig. 1).

L'indice chromique résiduel a augmenté quinze fois sur 20 ; chez 5 animaux il a doublé, chez 4 il a triplé.

Le glycogène hépatique de ces lapins a presque complètement disparu tandis que le glycogène musculaire a diminué de moitié environ.

Ces modifications biochimiques (*hypoglycémie très accentuée*, augmentation de l'indice chromique résiduel, épuisement complet des réserves de glycogène hépatique) indiquent clairement un trouble *profond du métabolisme glucidique* que nous attribuons à une atteinte du tissu hépatique par le poison phalloïdien. Le foie est en effet le centre du métabolisme glucidique ; une grave atteinte de cet organe entraîne une perturbation de ses différentes fonctions parmi lesquelles il convient de donner une place prépondérante à la fonction glycogénique.

Les autres modifications observées dans le cas de la mort rapide sont pour la plupart inconstantes, irrégulières.

Cinq lapins sur 20 ont accusé une hausse importante d'urée sanguine (1,76 g, 1,18 g, 1,03 g, 0,85 g, 0,81 g p. 1 000), 3 une augmentation plus légère (0,73 g, 0,64 g, 0,61 g p. 1 000).

Les variations du chlore sanguin ont été faibles, inconstantes, et n'ont pas toujours été de même sens pour le chlore plasmatique et le chlore globulaire. Il en est résulté un rapport érythroplasmatique très variable.

Nous avons noté une acidose chez 10 animaux sur 20 dès le lendemain de l'injection (volumes de CO_2 p. 100 : 17,6, 15,7, 14,7, 10,9, 9,9) ; chez les lapins morts en quarante-huit heures et dont la réserve a diminué, nous avons enregistré le surlendemain de l'injection, jour de leur mort, un retour à la normale de la réserve alcaline. L'acidose est par conséquent irrégulière, passagère, et la mort ne peut lui être attribuée.

Quatre lapins sur 20 ont présenté une hypercholestérolémie (1,19 g, 0,96 g, 0,94 g, 0,85 g p. 1 000).

Le taux de la glutathionémie a augmenté dans la moitié des cas. Les teneurs du glutathion hépatique et musculaire ont subi une chute très nette (50 p. 100 de la valeur normale) ; le glutathion dans les tissus rénal et pulmonaire a diminué dans quelques cas seulement. Cette baisse notable du taux du glutathion hépatique provoquée chez le lapin par l'intoxication phalloïdienne révèle un trouble du métabolisme du glutathion, le foie jouant un rôle capital dans ce métabolisme, rôle démontré par L. Binet et G. Wellers qui ont mis en évidence l'existence dans le foie d'un mécanisme régulateur des besoins immédiats des organes en glutathion. Ces mêmes auteurs n'ont-ils pas signalé que diverses atteintes du foie provoquaient une diminution sensible du taux du glutathion hépatique ?

En résumé, les modifications biochimiques relevées au cours de l'intoxication par l'Amanite phalloïde dans le cas de la mort rapide révèlent un trouble du métabolisme glucidique et un

trouble du métabolisme du glutathion que nous attribuons à une atteinte importante du tissu hépatique.

★★

Cette étude du syndrome humoral de l'empoisonnement phalloïdien montre l'action nocive exercée par l'Amanite phalloïde sur le foie. La destruction de la cellule hépatique est accompagnée de troubles des différents métabolismes dont le plus important est celui de la fonction glycogénique du foie. Le trouble du métabolisme glucidique qui aboutit à un épuisement complet des réserves du glycogène hépatique se manifeste sur le plan biochimique par une *hypoglycémie, phénomène caractéristique de l'intoxication*. L'hypoglycémie est tardive. La période de latence s'expliquerait par le temps nécessaire à la réalisation de la destruction de la cellule hépatique.

★★

L'importance de ces troubles du métabolisme glucidique dans l'intoxication fongique a été à l'origine de la médication correctrice glucosée recommandée dès 1936 par l'un de nous et J. Marek. Elle consiste en injection intraveineuse de sérum glucosé à 40 p. 1 000, faite à la dose de 20 cm³ et répétée quatre à cinq fois dans la journée, la première étant pratiquée huit à dix heures après le début de l'intoxication. L'ingestion de sucre de canne ou de miel est également indiquée dans l'intoxication qui nous retient. Les expériences de l'un de nous, avec J. Marek, sur les chiens et les lapins inoculés avec un extrait d'Amanite phalloïde et traités par la thérapeutique glucosée, ont prouvé l'efficacité de ce traitement. P. Moretti, J. Lefèvre, Munch, R. Moreaux ont rapporté plusieurs cas d'empoisonnement humain par ce champignon, qui furent traités avec plein succès par la médication sucrée. Cette thérapeutique est également utilisée en clinique pour combattre l'insuffisance hépatique. On admet que l'administration *per os* de glucides en grande quantité et surtout l'injection intraveineuse d'une solution hypertonique de glucose augmente le métabolisme glucidique.

L'hypoglycémie, constituant le syndrome majeur humoral de l'intoxication phalloïdienne, il nous a semblé intéressant d'aborder le comportement de l'animal diabétique, soumis à l'intoxication phalloïdienne.

J. Verne et ses élèves ont insisté, en 1950, sur la résistance à l'Amanite que présente le rat atteint de diabète alloxanique. De notre côté, avec G. Wellers, nous avons opéré sur deux lapins rendus diabétiques par une injection intraveineuse d'alloxane

(200 mg par kilogramme); lorsque le diabète fut installé, quarante-huit heures après l'administration d'alloxane, nous avons pratiqué chez ces animaux l'injection sous-cutanée d'une dose mortelle d'alcoolature : tous les deux ont survécu alors que cette dose toxique devait provoquer la mort en moins de trente heures.



La dégénérescence graisseuse du foie a été observée par de nombreux auteurs au cours de l'intoxication phalloïdienne. Il existe une hépatite toxique se traduisant histologiquement par une stéatose des cellules hépatiques, surtout intense autour de la veine centrolobulaire. N. Cova, E. Polli et G. Ratti ont étudié d'une façon approfondie la « stéatose hépatique adiponécrotique » provoquée par ce champignon. Nous-mêmes, avec notre regretté collaborateur P. Desclaux, avons noté, au cours des intoxications mortelles, d'importantes altérations cellulaires avec atteinte marquée des noyaux et surcharge lipidique des cellules, disparition du glycogène et des acides ribonucléiques sans trace de sclérose.

Le trouble du métabolisme des lipides est lié au trouble du métabolisme des glucides, ce qui aide à comprendre la dépendance qui existe entre la dégénérescence graisseuse et l'apport du sucre dans le foie. En effet, la médication glucosée, mise en œuvre précocement, avant que les cellules hépatiques ne soient complètement nécrosées, peut empêcher la dégénérescence. Si l'altération hépatique est plus profonde, on aboutit, malgré les traitements sucrés mis en œuvre, à la dégénérescence graisseuse par mortification de la cellule (lésions nucléaires : caryolyse, caryorexie).

Pour combattre l'altération de la cellule hépatique, pour lutter contre la dégénérescence graisseuse qui accompagne l'intoxication phalloïdienne, nous avons traité, avec G. Wellers, des lapins qui avaient reçu une dose mortelle de poison phalloïdien au moyen de méthionine (acétyl-dl-méthionine à 20 p. 100), puissant agent anti-stéatogène : 1 cm³ de cette solution injecté par voie intramusculaire, par kilogramme, matin et soir, a permis, une fois sur trois, de prolonger la vie de quatre jours, alors que les animaux témoins moururent en moins de trente heures ; 2 cm³ injectés par voie intramusculaire, par kilogramme, deux fois par jour, ont été sans effet une fois sur cinq ; deux fois ils ont assuré un temps de survie double du temps de survie des animaux témoins ; deux fois, ils ont empêché la mort et ont assuré une survie définitive. Nous avons noté, chez les animaux intoxiqués par l'Amanite et traités par l'acétyl-dl-méthionine, une hypoglycémie notable, alors que la solution de méthionine expérimentée

sur l'animal sain n'a pas d'action appréciable sur le taux du glucose sanguin.

Aussi croyons-nous devoir insister actuellement et sur la thérapeutique glucosée et sur la thérapeutique à base de méthionine.

Nous avons appliqué cette double thérapeutique et c'est elle qui nous a donné les meilleurs résultats chez nos lapins soumis à l'alcoolature phalloïdienne : traitement à la méthionine pour lutter contre la stéatose hépatique, traitement au glucose pour lutter contre l'hypoglycémie.

Ainsi ces nouveaux travaux constituent une nouvelle base pour soutenir les bienfaits d'une thérapeutique sucrée complétée par un traitement à la méthionine.

BIBLIOGRAPHIE

Nous ne rapportons ici que les travaux et publications de notre laboratoire.

- L. BINET et J. MAREK. *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **202**, 1219. — *Bull. Acad. Méd.*, 1936, **115**, 450. — *La Presse médicale*, 1936, n° 73, 1417. — *Bull. et Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1936, 3^e série, n° 22, 1098. — *LXIX^e Congrès des Soc. sav.*, Montpellier, 1936, 279. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 13.
- L. BINET, G. WELLERS et H. GOUDARD. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 1141. — *La Presse médicale*, 1937, n° 75, 1323.
- L. BINET et J. MAREK. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 285. — *Rev. scient.*, 1938, n° 4, 152. — *Synthèse*, 1938, n°s 7 et 8, 8.
- L. BINET, J. MAREK et M. BURSTEIN. *XII^e Réunion de l'Association des Physiöl. de langue française*, Louvain, 1938. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 272.
- L. BINET, R. FABRE et M^{lle} M. MARQUIS. *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **249**, 376.
- L. BINET. *Bull. Soc. Sci. Hyg. alim.*, 1946, **34**, 168.
- L. BINET et G. WELLERS. *J. Physiol.*, 1949, **41**, 130-A. — *XVII^e Réunion de l'Association des Physiöl. de langue française*, Montpellier, 31 mai, 1^{er} et 2 juin 1949.
- L. BINET, M^{lle} M. LEBLANC et G. WELLERS. *La Presse médicale*, 1950, n° 54, 938.
- L. BINET et M^{lle} M. LEBLANC. *Soc. de Méd. de Paris*, 20 octobre 1951. — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 279.
- L. BINET, P. DESCLAUX, H. CHANEAC et M^{lle} M. LEBLANC. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 405.
- L. BINET, P. DESCLAUX, H. CHANEAC et M^{lle} J. TEYSSEYRE. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 564.
- L. BINET, M^{lle} M. LEBLANC et G. WELLERS. *La Revue du Praticien*, 1952, **2**, 1445.
- M^{lle} M. LEBLANC. *Thèse Pharm.*, Paris, 1952.

L'ILOTYCINE (ERYTHROMYCINE). NOUVEL ANTIBIOTIQUE ÉLABORÉ PAR LE *STREPTOMYCES ERYTHREUS*

par C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-ÉVENO.

(Institut Alfred Fournier.)

L'Ilotycine, sécrétion fongique nouvellement découverte, offre une activité bactériostatique et germicide dont le périmètre est extrêmement vaste, aussi étendu que celui des meilleurs antibiotiques connus, tels l'Auréomycine, le Chloramphénicol et la Terramycine. Elle vient d'être découverte par McGuire, Bunch, Anderson, Boaz, Flynn, Powell et Smith [1], équipe des chercheurs travaillant dans les Laboratoires de recherches Lilly (Indianapolis, Indiana, U. S. A.). Dès la publication du mémoire préliminaire de ces chercheurs, nous avons saisi l'importance de leur découverte et nous les avons priés de bien vouloir nous faire parvenir une certaine quantité d'Ilotycine, ce qu'ils ont accepté de bonne grâce et ce dont nous les remercions vivement. Nous avons, de la sorte, entrepris des essais expérimentaux avec cet antibiotique, essais qui font l'objet du présent travail, lequel comporte, également, un exposé succinct des faits acquis aux Etats-Unis et en Angleterre [2].

DÉCOUVERTE DE L'ILOTYCINE. — C'est d'un échantillon de sol provenant de l'Archipel des Philippines que l'on isola l'actinomycète sécréteur, appartenant au genre *Streptomyces*, dont la morphologie, les caractères culturels et les propriétés physiologiques permirent de l'identifier. Il s'agit du *Streptomyces erythreus* (Waksman et Henrici) (l'antibiotique qu'il élabore fut désigné d'abord sous le nom d'*Erythromycine*, nom auquel celui d'*Ilotycine* fut substitué ultérieurement).

ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE DE L'ILOTYCINE. — Les premiers essais de la sécrétion fongique ont été effectués par la méthode des « stries » sur gélose à base de tryptone et de phosphate, ou par celle des milieux liquides (bouillon glucosé additionné de farine de soja). Ces techniques de titrage mirent à jour l'efficacité bactériostatique de l'antibiotique à l'égard du *Staphylococcus pyogenes*, de l'*Escherichia coli*, du *Mycobacterium tuberculosis* souche 607 (cultures agitées). Dans l'ensemble, réceptivité incon-

testable des germes Gram-positifs et, plus rarement, des microbes ne prenant pas le Gram.

PURIFICATION ET CRISTALLISATION. — Extraction par le benzène, l'acétate d'éthyle et le tétrachlorure de carbone, et obtention de cristaux d'antibiotique purifié. De tels cristaux sont solubles dans l'eau (2 mg par centimètre cube), fortement solubles dans les alcools, l'acétone, le chloroforme, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle, modérément solubles dans l'éther, le dichlorure d'éthylène et l'acétate d'amyle. Le principe actif, *composé basique*, forme facilement des sels avec divers acides.

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES ET PHYSIQUES. — Formule brute :



Pouvoir rotatoire : $(\alpha)_D^{25} = -78^\circ$ (concentration de 1,99 p. 100 dans l'alcool, après dessiccation sous vide). **Spectre en rayonnement ultra-violet :** maximum d'intensité faible à 280 m μ (pH 6,3).

Pouvoir antibiotique. Deux techniques : dilutions progressives en milieu liquide (bd) et stries sur gélose à laquelle l'antibiotique est incorporé (ag). Ci-dessous les résultats relatés par les observateurs américains (Cf. tableau I).

TABLEAU I.

MICROORGANISMES-TESTS	CONCENTRATION inhibitrice $\mu\text{g par cm}^3$
<i>Streptococcus hemolyticus</i> C203.	0,007
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	0,8 (ag)
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> (pénicillino-résistant).	0,4 (ag)
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> (streptomycino-résistant)	0,8 (ag)
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,31 (bd)
<i>Bacillus subtilis</i>	0,2 (ag)
<i>Vibrio cholerae</i>	0,63 (bd)
<i>Mycobacterium</i> sp. (607)	6,2 (ag)
<i>Mycobacterium phlei</i>	0,8 (ag)
<i>Hemophilus pertussis</i>	31 (bd)
<i>Mycobacterium avium</i>	1,6 (ag)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	6,2 (ag)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,2 (ag)
<i>Brucella melitensis</i>	1,56 (bd)
<i>Brucella suis</i>	1,56 (bd)
<i>Neisseria intracellularis</i>	5,0 (bd)
<i>Diplococcus pneumoniae</i> (sulfamido-résistant)	0,02 (bd)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,02 (bd)
<i>Hemophilus influenzae</i>	1,25 (bd)
<i>Streptococcus viridans</i>	0,16 (bd)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0,02 (bd)
<i>Vibrio comma</i>	6,25 (bd)

Il résulte de la lecture de ce tableau que la vulnérabilité des divers germes testés varie d'un microorganisme à l'autre et qu'il y a lieu de distinguer des bactériacées particulièrement sensibles et d'autres qui le sont considérablement moins. Au surplus, un fait important s'en dégage : l'*Ilotycine agit bactériostatiquement sur des germes réputés résistants à la Pénicilline, à la Streptomycine et à des sulfamides.*

ILOTYCINO-RÉSISTANCE. — Il est possible, en utilisant les techniques en usage, de créer artificiellement des souches de bactéries ilotycino-résistantes, en particulier de *Staphylococcus aureus*.

RÉSORPTION ; DISPERSION. — L'*Ilotycine*, administrée *per os*, diffuse dans le sang, l'urine et, à l'état de traces, dans le liquide céphalo-rachidien (1) ; elle est éliminée par les fèces. Des essais utilisant comme test le *Streptococcus hemolyticus* ont permis de conclure que l'antibiotique apparaît très rapidement dans la circulation sanguine et s'y maintient jusqu'à la huitième heure (maximum vers la première heure).

ACTIVITÉ CURATIVE *in vivo*. — Des expériences, effectuées soit sur l'œuf incubé de poule, soit sur la souris, montrent que l'*Ilotycine* est douée d'une certaine action curative dans la bacilliose provoquée par le *Mycobacterium tuberculosis* (souche H₃₇Rv), ainsi que dans la lymphogranulomatose inguinale, la méningo-pneumonie de la souris, les Rickettsioses, l'amibiase (*Endamæba histolytica*), les spirochètoses (*Spirochæta novyi*), certaines parasitoses (*Trichomonas vaginalis* et oxyures).

TOXICITÉ ; TOLÉRANCE. — L'*Ilotycine* est très peu toxique. Elle est bien supportée *per os*, de même qu'en injection sous-cutanée. La DM₅₀ pour la souris est de 1 800 mg par kilogramme. Le chien supporte l'antibiotique administré pendant une longue période de temps.

Ce sont là, résumées dans leur essentiel, les données faisant l'objet du mémoire préliminaire de McGuire et de ses collaborateurs. Depuis, d'autres travaux sont parus, dont voici une brève analyse :

Haight et Finland [3] ont examiné certains problèmes relatifs à l'*Ilotycine* en se servant de très nombreuses souches microbiennes appartenant à des genres divers et isolées de malades. Selon eux, la résorption de l'antibiotique chez l'homme est directement proportionnelle à la dose administrée *per os* (de 100

(1) Voir également ci-après.

à 500 mg, répétés toutes les trois heures). La concentration maxima dans le plasma est atteinte après une à deux heures ; elle persiste pendant six heures (ou plus, si la quantité ingérée est supérieure). La posologie comporte des prises de 250 mg à des intervalles de trois heures. Le dosage de l'élimination urinaire montre que l'Ilotycine excrétée atteint 15 p. 100 du total ingéré par voie buccale (doses réitérées). L'antibiotique se détruit, tout au moins partiellement, à la température ordinaire ou à 37°, mais il garde son activité s'il est conservé au froid ou congelé. L'alcalinité du milieu favorise ses effets bactériostatiques, dont l'intensité s'amenuise après filtration. Aucune des substances empêchantes à l'égard d'autres sécrétions fongiques (acide p.aminobenzoïque, acide ptéroylglutamique, thioglycolate de Na, urée, etc.), n'inhibe l'Ilotycine, et, par ailleurs, il n'y a pas élaboration d'ilotycinase. *Comparée aux autres antibiotiques, l'Ilotycine se rapproche intimement de la Pénicilline.* Elle agit, en effet, bien plus sur les bactériacées Gram-positives que sur celles ne prenant pas le Gram (excepté la *Neisseria* et l'*Hemophilus*). Enfin, à l'exemple de Mc Guire et de ses collaborateurs, Haight et Finland montrent que l'Ilotycine inhibe les *STAPHYLOCOCCUS AUREUS pénicillino-résistants*. Haight et Finland [4] sont revenus ultérieurement sur les mêmes problèmes dans le cadre d'une étude sur l'état réfactaire anti-ilotycinique des staphylocoques et des streptocoques pour conclure que l'antibiotique peut être soit bactériostatique, soit microbicide selon la sensibilité du microorganisme et la teneur en principe actif. Après 3 à 12 repiquages en présence de concentrations croissantes d'Ilotycine, des souches sont devenues cinq cent douze fois plus résistantes qu'elles ne l'étaient à l'origine. L'antibiotique n'agit que sur des germes en voie de multiplication.

UTILISATION DE L'ILOTYCINE EN PATHOLOGIE HUMAINE. — Déjà dans leur travail de base McGuire et ses collaborateurs annonçaient les effets salutaires de l'Ilotycine dans certains processus pathologiques humains provoqués par le *Streptococcus hemolyticus* β et le pneumocoque. Mais d'autres données, plus précises, viennent d'être recueillies par Haight et Finland [5]. Elles ont trait à l'utilisation de la cure ilotycinique chez des sujets atteints de pneumonie lobaire, de streptococcie scarlatineuse, de diphtérie et de staphylococcie. Chez 14 pneumoniques sur 16 traités, l'emploi, toutes les trois heures, de 100 à 125 mg (plus rarement de 200 à 250 mg) a déclenché des effets curatifs éminemment satisfaisants, en ce sens que les malades devinrent afebriles dès le deuxième jour, que les pneumocoques disparurent des crachats dès le troisième et que les hémocultures se stérilisèrent rapidement. Dans 13 cas d'angine streptococcique

scarlatineuse, les streptocoques cessèrent d'être présents dans les amygdales et la fièvre tomba en vingt-quatre à quarante-huit heures. Des résultats analogues ont été obtenus chez des patients atteints de staphylococcie (pharyngites, entérites, méningite, pneumopathies), mais non pas chez d'autres offrant des signes d'endocardite. Résultats pratiquement négatifs dans la blennorragie aiguë (2 succès et 2 échecs à la suite de l'emploi de 1 à 2 g d'Ilotycine). Selon les auteurs, l'antibiotique, du point de vue de la thérapeutique humaine, se rapproche de la Pénicilline.

Citons, enfin, un important mémoire de Heilman, Herrell, et Geraci [6] paru récemment. Il y est question de l'Ilotycine considérée du point de vue de son activité *in vitro* et dans quelques infections expérimentales, de sa résorption et de son élimination, ainsi que de son utilisation au lit du malade. En ce qui concerne les propriétés bactériostatiques dans le tube à essai, Heilman et ses collaborateurs reconnaissent que le pouvoir inhibiteur de l'antibiotique est infiniment plus accusé à l'égard des bactériacées Gram-positives que vis-à-vis de celles qui ne prennent pas le Gram, excepté l'*Hemophilus pertussis*, qu'une nette réceptivité caractérise, réceptivité comparable à celle des *Corynebacterium*. L'Ilotycine exerce une influence nocive sur des germes rendus résistants à la plupart des antibiotiques connus. Du point de vue expérimental, il y a lieu de signaler ses effets curatifs dans l'infection de la souris provoquée par le virus de la psittacose, lequel se comporte à l'exemple de l'ultragerme lymphogranulomateux, ainsi que dans celle du cobaye contaminé par le *Corynebacterium diphtheriae*. Après administration par voie buccale, Heilman et ses collaborateurs la retrouvent rapidement dans la circulation sanguine; elle diffuse dans les organes et s'élimine par le rein, la bile, et aussi par la muqueuse intestinale et le placenta. Administré au malade, l'antibiotique se montre doué d'une action salutaire dans l'amygdalite folliculaire aiguë associée à de l'adénopathie, dans l'endocardite bactérienne subaiguë, les septicémies staphylococciques, l'ostéomyélite, les pharyngites, l'érysipèle facial, etc. Des courbes thermiques illustrent le travail des auteurs américains.

Recherches personnelles.

Nous avons effectué un certain nombre d'essais se rapportant aux problèmes suivants : 1° Bactériostase *in vitro* à l'égard de divers microorganismes, y compris le *Mycobacterium tuberculosis*; 2° Activité bactériostatique sur des germes rendus résistants à des antibiotiques autres que l'Ilotycine; 3° Effets curatifs dans des infections engendrées par des bactériacées; 4° Mêmes

effets dans les spirilloses et les spirochétoses, ainsi que dans les protozooses ; 5° Virocidie. Voici en résumé, nos résultats :

1° BACTÉRIOSTASE A L'ÉGARD DE DIVERSES BACTÉRIACÉES. — Nos études ont été effectuées grâce à l'emploi de trois méthodes : dilutions progressives de 10 en 10 (bouillon Truche ; volume total, 5 ml ; inoculum, 0,5 cm³ d'une suspension à 10⁻⁴-10⁻⁷ d'une culture âgée de vingt-quatre heures sur le même bouillon) ; technique de Heatley [7] (cylindres appliqués sur des plaques de gélose solidifiée) ; procédé de Vincent et Vincent [8] (rondelles de papier filtre ; même gélose).

A. — MÉTHODES DES DILUTIONS PROGRESSIVES
EN BOUILLON TRUCHE (Cf. tableau II).

La dose limite inhibitrice [*Dmb* (2)], calculée par centimètre cube, a varié d'une espèce de germes à l'autre. Il y a lieu de distinguer les microorganismes les plus sensibles (*Staphylococcus*

TABLEAU II. — Bactéries.

Méthode des dilutions progressives en bouillon Truche.

	POIDS PAR CM ³					
	1 mg	100 µg	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,01 µg
<i>Staphylococcus aureus</i> O 10 ⁻⁴	0	0	0	0	1	4
<i>Bac. subtilis</i> 10 ⁻⁴	0	0	0	0	4	4
<i>Bac. anthracis</i> C 10 ⁻⁴	0	0	0	1	4	4
<i>Myc. smegmatis</i> 10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	4
<i>Myc.</i> 607 10 ⁻⁴	0	0	1	4	4	4
<i>Shigella para-dysenteriae</i> Y 6 R 10 ⁻⁴	0	0	4	4	4	4
<i>Proteus vulgaris</i> 10 ⁻⁴	0	4	4	4	4	4
<i>Escherichia coli</i> S 10 ⁻⁷	0	4	4	4	4	4
<i>Eberthella typhosa</i> D 10 ⁻⁷	0	4	4	4	4	4
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0	4	4	4	4	4
<i>Bac. de Friedländer</i> Ch. 10 ⁻⁴	1	4	4	4	4	4
<i>Bact. ærtricke</i> 10 ⁻⁴	1	4	4	4	4	4

aureus O, *Bacillus anthracis* et *Mycobacterium smegmatis* (*Dmb* = 0,1 ; 1 ; 10 µg), du reste des germes qui se sont révélés les moins réceptifs (100 µg à 1 mg). Selon nos résultats, l'activité

(2) Nous désignons par l'abréviation *Dmb* la dose minima d'antibiotique par centimètre cube pouvant déclencher la bactériostase et par l'abréviation *DMr* la dose maxima d'antibiotique par centimètre cube capable de déterminer la résistance.

bactériostatique de l'Ilotycine n'a pas semblé être d'une intensité exceptionnellement accusée.

Nous avons eu soin de comparer les données concernant l'activité bactériostatique de trois microbes, soit le *Staphylococcus aureus*, le *Bacillus subtilis* et le *Mycobacterium smegmatis*, à celles enregistrées par McGuire et ses collaborateurs (*loc. cit.*) [il est vrai par une technique différente de la nôtre : titrage en milieu de gélose solidifiée]. Il résulte de cette comparaison une équivalence de la *Dmb* concernant le *Staphylococcus aureus* (0,8 µg et 1 µg), mais, par contre, une infériorité marquée de cette même *Dmb* pour le *Bac. subtilis* et le *Mycobact. smegmatis*.

2° MÉTHODES DE HEATLEY ET DE VINCENT (*Cf.* tableaux III et IV).

— La bactériostase, évaluée par ces deux techniques de diffusion, s'est révélée assez variable d'un germe à l'autre. A retenir l'absence totale d'inhibition avec le *Proteus vulgaris* (méthode Heatley et Vincent), le bacille de Friedländer, l'*Eberthella typhosa* et le *Mycobacterium smegmatis* (méthode de Vincent).

BACTERIOSTASE A L'ÉGARD DES *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, H 512 ET S. A. P. C. (*Cf.* tableau V).

TECHNIQUES. — Dilutions progressives de 10 en 10 (milieu Dubos et Lockman). Inoculum, 10⁻²⁰. Temps de séjour à 37°, de cinq à huit jours selon la souche utilisée.

TABLEAU III. — Méthode de Heatley.

	POIDS PAR CM ³		
	2 mg (mm)	1 mg (mm)	100 µg (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> O	22	18	16
<i>Escherichia coli</i> S.	22	18	18
<i>Eberthella typhosa</i> D	18	15	12
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0
<i>Bac. anthracis</i> C	30	30	27
<i>Shigella para-dysenteriae</i>	20	16	16
<i>Salmonella paratyphi</i>	16	14	12
<i>Bac. de Friedländer</i>	35	30	25
<i>Bact. ærtricke</i>	16	15	12
<i>Pseudomonas æruginosa</i>	18	17	12
<i>Bac. subtilis</i> B 90	28	25	25
<i>Myc.</i> 607	22	18	15
<i>Myc. smegmatis</i>	30	27	20

TABLEAU IV. — Méthode de Vincent.

	POIDS PAR CM ³		
	2 mg (mm)	1 mg (mm)	100 µg (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> O	20	15	11
<i>Escherichia coli</i> S.	10	9	0
<i>Eberthella typhosa</i> D	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0
<i>Bac. anthracis</i> C	20	15	12
<i>Shigella para-dysenteriae</i>	14	12	9
<i>Salmonella paratyphi</i> A	Traces.	0	0
<i>Bac. de Friedländer</i>	0	0	0
<i>Bact. ærtricke</i>	Traces.	0	0
<i>Pseudomonas æruginosa</i>	17	15	12
<i>Bac. subtilis</i> B 90.	25	25	20
<i>Myc. 607</i>	12	0	0
<i>Myc. smegmatis</i> (pousse difficile).	0	0	0

TABLEAU V. — Action bactériostatique de l'Ilotycine à l'égard des BKH₃₇ Rv, H 512 (virulents) et SAPC (non pathogène).

H ₃₇ Rv :							
Poids par cm ³ . . .	1 mg	40 µg	20 µg	2 µg	0,1 µg	0,01 µg	Témoin.
Lecture le 5 ^e jour . .	0	0	2	3	3	4	4
H 512 :							
Poids par cm ³ . . .	1 mg	100 µg	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,001 µg	Témoin.
Lecture le 4 ^e jour . .	0	0	0	2	2	4	4
SAPC :							
Poids par cm ³ . . .	1 mg	100 µg	10 µg	1 µg	0,1 µg	0,001 µg	Témoin.
Lecture le 9 ^e jour . .	0	0	0	0	2	2	4

Il en résulte que l'activité bactériostatique de l'Ilotycine à l'égard des bacilles acido-résistants virulents H₃₇Rv et H 512 a été de Dmb = 40 µg et de Dmb 10 µg, alors que la Dmb du bacille non pathogène SAPC a atteint 1 µg par centimètre cube, donc nettement supérieure.

★
★ ★

En rapport avec les résultats de McGuire et ses collaborateurs, nous avons soumis à l'étude le problème suivant : soit un microorganisme donné, tel le *Staphylococcus aureus*, l'*Eberthella typhosa*, l'*Escherichia coli* ou le *Proteus vulgaris*, ayant acquis une résistance plus ou moins marquée à l'égard du Chloramphénicol ou de la Pénicilline. Comment se comportera-

t-il en comparaison du même germe normal (*Dmb*), à l'égard de l'Ilotycine ? L'état réfractaire créé aura-t-il ou non modifié sa sensibilité vis-à-vis de ce dernier antibiotique (*DMr*) ? Les données condensées dans le tableau VI permettent de conclure que ce comportement varie selon la nature du germe envisagé, et aussi suivant l'antibiotique considéré. Ainsi, avec le *Staphylococcus aureus* et l'*Escherichia coli*, si l'état réfractaire acquis à l'égard du Chloramphénicol a eu pour effet un accroissement manifeste de la résistance ilotycinique initiale, par contre, lorsqu'il s'est agi de l'*Eberthella typhosa* et du *Proteus vulgaris*, nulle résistance n'est apparue vis-à-vis de l'Ilotycine. De telles conclusions ne sont pas sans conséquences dans le domaine de l'utilisation pratique de l'Ilotycine. En effet, il est à prévoir que celle-ci sera efficace dans certaines infections provoquées par des micro-organismes devenus insensibles à d'autres antibiotiques (3).

TABLEAU VI. — Comportement vis-à-vis des effets bactériostatiques de l'Ilotycine de quatre germes rendus réfractaires au Chloramphénicol et à la Pénicilline.

MICROORGANISMES TESTÉS									
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Eberthella typhosa</i> D		<i>Escherichia coli</i> S			<i>Proteus vulgaris</i>		
Normal <i>Dmb</i>	Résistant au Chloramphénicol <i>DMr</i> : 200 µg	Normal <i>Dmb</i>	Résistant au Chloramphénicol <i>DMr</i> : 150 µg	Normal <i>Dmb</i>	Résistant au Chloramphénicol <i>DMr</i> : 1 mg	Résistant à la Pénicilline 24/0 U	Normal <i>Dmb</i>	Résistant au Chloramphénicol <i>DMr</i> : 1 mg	Résistant à la Pénicilline 10.000 U
Ilot : 0,25 µg	Ilot : 100 µg	Ilot : 1 mg	Ilot : 1 mg	Ilot : 500 µg	Ilot : 1 mg	Ilot : 500 µg	Ilot : 1 mg	Ilot : 1 mg	Ilot : 1 mg

(3) Rantz et Randall (*Antib. Chemoth.*, 1952, 2, 645) ont récemment effectué des essais sur l'Ilotycine, dans le cadre d'une étude sur la synergie entre antibiotiques (organisme-test : *Staphylococcus aureus*). Toutes les souches de staphylocoques soumises à l'épreuve ont été inhibées par des concentrations de 0,2 ou 0,4 µg par centimètre cube (sauf une qui a nécessité 1,0 µg par centimètre cube). Utilisée en association, l'Ilotycine n'a eu aucune action synergique avec la Pénicilline, la Terramycine ou le Chloramphénicol, alors qu'avec la Streptomycine et la Bacitracine elle a fourni des mélanges doués de pouvoir bactéricide à l'égard d'un grand nombre des souches de *Staphylococcus* étudiés. Les germes streptomycino-résistants ont été réfractaires à cette action bactéricide synergique des associations Ilotycine-Streptomycine.

B. — ACTIVITÉ CURATIVE DE L'ILOTYCINE
DANS LES INFECTIONS EXPÉRIMENTALES DE LA SOURIS ET DU LAPIN.

1° *Bactériacées* (Cf. tableau VII).

TECHNIQUE. — Contamination par injection intrapéritonéale d'un certain nombre de doses mortelles (suspension de cultures âgées de 24 heures, additionnées ou non de mucine). Traitement par injection sous-cutanée de 10 mg d'antibiotique (par sujet de 20 g) à une ou plusieurs reprises quotidiennes, soit la moitié de la dose tolérée indiquée par les auteurs américains (20 mg par 20 g).

TABLEAU VII.

<i>Staphylococcus aureus</i> O 10 ⁻⁵ + Mucine 55 (1 ♀ antib.)		<i>Staphylococcus aureus</i> O 10 ⁻⁵ + Mucine (3 ♀ antib.)		<i>Diplococcus pneumoniae</i> 11 (1) 10 ⁻³		<i>Escherichia coli</i> 5 10 ⁻⁵ + Mucine (1)		<i>Streptococcus hemolyticus</i> M 10 ⁻³	
Survie des traitées p. 100	Survie des témoins p. 100	Survie des traitées p. 100	Survie des témoins p. 100	Survie des traitées p. 100	Survie des témoins p. 100	Survie des traitées p. 100	Survie des témoins p. 100	Survie des traitées p. 100	Survie des témoins p. 100
39	0	100	0	35	0	60	0	100	0

(1) L'utilisation, à trois reprises, de la dose thérapeutique dans l'infection provoquée par le *Diplococcus pneumoniae* et l'*Escherichia coli* a permis une survie de 100 p. 100.

Le tableau VII permet de conclure que l'Ilotycine est douée de propriétés curatives dans les processus infectieux provoqués chez la souris par le *Staphylococcus aureus*, le *Diplococcus pneumoniae*, l'*Escherichia coli* et le *Streptococcus hemolyticus*; à condition d'utiliser des doses d'antibiotique répétées, les survies peuvent atteindre 100 p. 100.

2° *Mycobacterium tuberculosis*.

Nous nous sommes servis de la technique appliquée dans nos recherches concernant les effets antituberculeux des antibiotiques, tels la Streptomycine et la Néomycine, ou de corps chimiques synthétiques, entre autres le dérivé 469 de Girard et de l'isonicotinhydrazide [9]. Contamination des souris par voie intraveineuse avec la souche de B. K. H₃₇Rv et administration du médicament soit *per os*, soit par injection sous-cutanée. Ci-dessous les résultats enregistrés avec l'Ilotycine.

Souris tuberculisées (1 mg de B. K. H₃₇Rv) au nombre de 20.

Dix sujets traités avec 10 mg d'Ilotycine par jour et par voie sous-cutanée et 10 autres témoins non traités.

RÉSULTATS :

1° *Souris témoins*. a) *Mortalité* (entre vingt-deux et vingt-sept jours) : 100 p. 100. b) *Lésions microscopiques pulmonaires* : entre +++ et ∞ : 100 p. 100. c) *Taux bacillaires pulmonaires* : ∞ . 100 p. 100.

Donc, *infection bacillaire térébrante et constamment mortelle*.

2° *Souris traitées*. a) *Mortalité* (entre vingt-sept et vingt-neuf jours) : 60 p. 100 ; Survie : 40 p. 100 (sacrifiées le 31^e jour). b) *Lésions microscopiques pulmonaires* : entre +++ et ∞ : 100 p. 100 (∞ : 60 p. 100). Présence de BK dans la rate (100 p. 100), dans le foie (50 p. 100) et dans le rein (40 p. 100).

Il résulte de l'ensemble de cet essai que, si l'on en juge par l'incidence de la mortalité, l'Ilotycine apparaît douée d'une certaine activité antituberculeuse, mais celle-ci est presque nulle si l'on tient compte du taux bacillaire pulmonaire, lequel est le même, peu importe qu'il s'agisse de souris témoins ou d'animaux traités par une dose d'antibiotique atteignant 240 mg par souris de 20 g.

C. — SPIRILLES ET SPIROCHÈTES.

1° *SPIRILLES RÉCURRENTIELS*. — Des souris sont inoculées, par voie coelomique, avec du sang d'autres souris riches en *Borrelia duttoni*. Traitement par 10 mg (par 20 g) d'Ilotycine en injection sous-cutanée et à trois reprises journalières. Les animaux sont restés à l'abri de la spirillose pendant douze jours, alors que les sujets témoins, contaminés de la même manière, mais non traités, ont contracté une spirillose mortelle dès le lendemain de l'inoculation infectante. Les souris traitées ont été sacrifiées et une émulsion de leur cerveau a été administrée à des souris neuves ; aucune de celles-ci n'a contracté la parasitose. Donc *activité curative manifeste*.

2° « *TREPONEMA PALLIDUM* ». — On injecte à un lapin (n° 31), porteur de deux chancres syphilitiques (souche Gand ; diamètres 28 × 32 mm et 14 × 13 mm), riches en tréponèmes, 100 mg d'Ilotycine par kilogramme à quatre reprises quotidiennes (au total : 400 mg par kilogramme). Les spirochètes, encore présents et mobiles le lendemain de l'infection, sont devenus plus rares et partiellement immobiles le deuxième jour, alors que le syphilome a commencé à se ramollir. Aspirochétose totale le troisième jour (diamètres dès le lendemain : 25 × 20 mm et 12 × 10 mm). Le

septième jour les chancres sont très réduits de volume (15×12 mm); ils s'effacent radicalement le onzième jour.

L'Ilotycine est donc tréponémicide in vivo.

D. — PROTOZOAIRES.

1° *Trypanosoma equiperdum*. — Infection intrapéritonéale des souris avec des trypanosomes; traitement par 10 mg (par 20 g), en injection sous-cutanée et à trois reprises. Pareillement aux témoins non traités, ces sujets ont contracté une infection mortelle dès le troisième jour.

Effets nuls.

2° *Plasmodium berghei*. — Les souris contaminées avec ce *Plasmodium*, puis traitées par l'antibiotique à raison de quatre injections quotidiennes de 10 mg (par 20 g), de même que les souris témoins ont contracté l'infection (survie moyenne, respectivement, de dix-sept et de dix-huit jours). *Aucune activité curative.*

CONCLUSIONS D'ENSEMBLE. — Nos recherches se référant à l'activité exercée soit *in vitro*, soit dans l'organisme vivant, mettent en lumière le pouvoir bactériostatique et jusqu'à un certain degré microbicide, de l'Ilotycine à l'égard de bon nombre de bactériacées, ainsi que son efficacité dans les processus provoqués par des spirilles et des spirochètes (*Borrelia duttoni* et *Treponema pallidum*). Au surplus, l'antibiotique semble agir sur des micro-organismes devenus réfractaires à d'autres sécrétions fongiques. Par contre, l'Ilotycine est dépourvue d'effets salutaires dans les trypanosomiases (*Trypanosoma equiperdum*) et à l'égard de certains hématozoaires (*Plasmodium berghei*).

E. — ACTION VIRULICIDE *in vitro* DE L'ILOTYCINE SUR LES ULTRAVIRUS.

1° VIRUS VACCINAL (souche Nélis). — Emulsion de testicules de lapin, additionnée d'Ilotycine à la dose de 1 mg par centimètre cube. Contact quatre heures à 37° et vingt-quatre heures à la glacière. La même suspension virulente, non additionnée d'antibiotique, sert de témoin; test vaccino-gène par inoculation intradermique au lapin (doses: émulsion concentrée ou diluée au 1/10 et au 1/100).

Résultat: Papulo-pustules jennériennes intenses le deuxième et le troisième jour (aucun effet de l'Ilotycine utilisée seule). *Activité virulicide nulle.*

2° VIRUS RABIQUE (souche Tanger négro-gène). — Emulsion de cerveau de lapin mort de rage additionnée de 1 mg d'Ilotycine

par centimètre cube. Contact pendant quatre heures à 37° et vingt-quatre à la glacière. La même émulsion, dépourvue d'antibiotique, sert de témoin. Inoculation intracérébrale à des souris. 1° Emulsion rabique témoin : 3 souris mortes le onzième jour. 2° Emulsion ilotycinisée : 3 souris mortes les onzième, quinzième et dix-septième jours. *Examen microscopique* : souris témoin, 3/3 ; souris *virus* + *antibiotique*, 2/3.

Résultat : Nul effet virulicide.

3° VIRUS HERPÉTIQUE (souche Bruxelles). — Emulsion préparée avec des cerveaux de souris mortes d'encéphalite herpétique, additionnée d'antibiotique (1 mg par centimètre cube). Contact pendant quatre heures à 37° et vingt-quatre heures à la glacière. Emulsion témoin exempte d'Ilotycine. Mêmes tests sur la souris. *Résultats* : mélange de virus et d'antibiotique, 3 souris mortes les septième, huitième et douzième jours ; émulsion virulente témoin, 4 souris mortes les cinquième et septième jours. *Examen microscopique* : souris témoins, 4/4 ; souris *virus* + *antibiotique*, 3/3.

Conclusion : Effet virulicide nul.

4° VIRUS COXSACKIE (souche encéphalitogène B). — Emulsion cérébrale provenant de 5 souriceaux morts d'encéphalite à virus Coxsackie B, additionnée d'Ilotycine (1 mg par centimètre cube). Contact pendant quatre heures à 37° et vingt-quatre heures à la glacière. Emulsion témoin exempte d'antibiotique. Inoculation à des souriceaux par voie transcranienne. *Résultats. Série ilotycinisée* : souriceaux morts entre le deuxième et le sixième jour. *Série témoin* : 7 souriceaux morts entre le deuxième et le quatrième jour. *Examen histologique de l'encéphale* : lésions moyennes ou intenses de type *Coxsackie*.

Conclusion : Effet virulicide nul.

De l'ensemble de ces constatations il découle que l'Ilotycine, testée sur quatre ultravirus (jennérien, rage, herpès et Coxsackie) se révèle incapable de détruire in vitro l'activité pathogène de ces ultravirus.

F. — ACTION VIRULICIDE *in vivo* DE L'ILOTYCINE DANS DES AFFECTIONS PROVOQUÉES PAR LES ULTRAVIRUS.

Dans cette série d'essais il est question d'effets curatifs de l'Ilotycine dans les infections provoquées chez la souris par certains ultragermes. La technique utilisée a été la suivante : des souris sont contaminées par voie intracérébrale ; les unes sont traitées par l'antibiotique, administré (voie sous-cutanée) à la dose de 10 mg par jour, pendant cinq jours ; les autres, non traitées, servent de témoins.

1° VIRUS POLIOMYÉLITIQUE (souche Theiler). — a) Cinq souris témoins (mortes du deuxième au sixième jour) ; b) 5 *sujets traités* (morts entre le cinquième et le septième jour). *Examen histologique : positif.*

Aucun effet curatif.

2° VIRUS HERPÉTIQUE (souche Bruxelles). — Même dispositif expérimental : 5 *souris témoins* (mortes du deuxième au sixième jour) ; 4 *sujets traités* (décès en deux à cinq jours). *Examen histologique : positif.*

Nulle activité thérapeutique.

3° VIRUS RABIQUE (souche Tanger négrigène). — Même technique : 5 *souris témoins* (mortes entre le septième et le neuvième jour) ; 5 *sujets traités* (décès dans le même laps de temps). *Examen histologique et corps de Negri : positifs 5/5.*

Activité nulle.

4° VIRUS GRIPPAL (souche PR 8). — Des expériences ont été effectuées par M. Reinié sur notre demande, dans le service de M. Lépine, à l'Institut Pasteur. En voici les résultats :

Des mélanges d'Ilotycine (1 à 5 mg) et de virus (liquide allantoïdien dilué à 10⁻⁵) ont été préparés immédiatement avant leur inoculation à des œufs incubés de poule (0,15 cm³ virus et 0,15 cm³ antibiotique). Des œufs inoculés avec le virus seul ont servi de témoins.

CONCLUSION. — *Le taux de l'hémagglutination (entre 10 et 5120) a mis en évidence l'absence totale d'effets virulicides.*

5° ULTRAVIRUS AMARIL (souche neurotrope de Dakar). — MM. Panthier et Husson ont réalisé, sur notre demande, dans le service de la fièvre jaune de l'Institut Pasteur, des essais sur les effets curatifs de l'Ilotycine dans l'infection de la souris provoquée par ce virus. Voici les protocoles que nous ont communiqués ces chercheurs :

Dix souris sont traitées pendant neuf jours par des injections quotidiennes de 0,1 g d'antibiotique finement broyé et mis en suspension dans 0,5 ml d'eau physiologique, administrées par voie intrapéritonéale. Le jour de la deuxième injection, ces 10 souris, ainsi que 8 souris témoins, sont éprouvées, par voie intracérébrale, et reçoivent chacune 10 doses léthales 50 p. 100 (DM₅₀) de virus. Ces souris étant gardées en observation pendant vingt jours, leur presque totalité est morte entre le sixième et le quatorzième jour, aussi bien celles traitées que les témoins. Une souris sur dix a survécu parmi les animaux traités et une souris sur huit des témoins. La maladie expérimentale n'a subi aucune modification par rapport à celle observée chez ces témoins.

CONCLUSION. — *Dans les limites de ces essais, aucune différence significative n'est apparue sous l'influence de l'Ilotycine entre les souris traitées et non traitées.*

6° VIRUS DE LA PSITTACOSE (souche 6 BC). — Des expériences ont été effectuées sur notre demande, dans le service de M. Lépine, à l'Institut Pasteur. Utilisation du virus contenu dans le sac vitellin (dilution à 1/10 000). Mélanges de virus et d'Ilotycine préparés au moment de leur inoculation à des œufs incubés de poule. Chaque œuf reçoit 0,4 cm³ d'un mélange de 0,32 cm³ d'antibiotique. D'autres œufs sont inoculés avec le virus seul. Les embryons témoins sont tous morts entre le cinquième et le sixième jour (frottis du sac vitellin positifs). Les traités (1 à 5 mg) ont survécu [à l'exception d'un seul (contrôle chez la souris : négatif)].

CONCLUSION. — *Effets virulicides manifestes.*

7° LYMPHOGRANULOMATOSE INGUINALE (maladie de Nicolas-Favre). — *Souris témoins* au nombre de 6. Deux, parmi elles, sont mortes le treizième et le dix-septième jour ; les 4 autres ont été sacrifiées malades le dix-septième jour. *Souris traitées* : sacrifiées non malades le dix-septième jour. *Examen histologique* : 6 souris témoins, positif (5/5) ; 6 souris traitées, négatif (5/6).

CONCLUSION. — Quelle que soit la technique expérimentale utilisée, il est impossible de mettre en évidence une activité quelconque de l'Ilotycine soit *in vitro*, soit chez l'animal, à l'égard des ultravirus. La lymphogranulomatose inguinale (maladie de Nicolas-Favre) et la psittacose font exception, mais on sait que les agents étiologiques qui les provoquent appartiennent à un groupe particulier d'ultragermes comprenant ceux de la psittacose-ornithose et des pneumonies atypiques, groupe distinct des virus proprement dits. *Cet ensemble de constatations est un nouvel exemple plaidant en faveur de la loi selon laquelle les ultravirus sont généralement insensibles à l'action des antibiotiques antimicrobiens* [10].

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

L'Ilotycine (ou Erythromycine), découverte par McGuire, Bunch, Anderson, Boaz, Flynn, Powell et Smith, est un antibiotique dont le périmètre bactériostatique est remarquablement étendu. Elle agit curativement dans bon nombre de processus infectieux expérimentaux provoqués par des bactériacées non acido-résistantes (entre autres les staphylocoques, les streptocoques, le *Diplococcus pneumoniae*, l'*Escherichia coli*, les *Neisseria*, les *Brucella*, les *Hemophilus*), même lorsque ces germes sont devenus

réfractaires à d'autres sécrétions fongiques. Elle se comporte de même dans les spirilloses et spirochètoses, les rickettsioses, l'amibiase, la méningo-pneumonie et aussi dans la lymphogranulomatose inguinale (maladie de Nicolas-Farre) et la psittacose. Ajoutons que quelques essais effectués en pathologie humaine confirment la réalité des effets salutaires antimicrobiens de l'Ilotycine mis en lumière par l'expérimentation (4).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Mc GUIRE et Collab. *Antib. Chemoth.*, 1952, **2**, 281. Editorial de la même revue, 1952, **2**, 279.
- [2] Des revues succinctes sur le même sujet ont été publiées par PLICHET (*La Presse Médicale*, 1952, n° 68, 1469), dans un éditorial du *Brit. Med. J.* (1952, 15 nov., 1085) et par CANDELA (*Medicina*, 1952, **20**, 196).
- [3] HAIGHT et collab., *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1952, **81**, 175.
- [4] HAIGHT et collab., *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1952, **81**, 183.
- [5] HAIGHT et collab., *New England J. Med.*, 1952, **247**, 227.
- [6] HEILMAN et collab., *Proceed. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1952, **27**, 285.
- [7] HEATLEY, *Biochem. J.*, 1945, **38**, 1.
- [8] VINCENT et VINCENT, *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **55**, 162.
- [9] C. LEVADITI, VAISMAN et CHAIGNEAU-ERHARD, *Ces Annales*, 1952, **83**, 127.
- [10] C. LEVADITI, *La Presse Médicale*, 1952, **7**, 133.

(4) Depuis la remise du présent mémoire à la rédaction, plusieurs travaux sont parus concernant l'Ilotycine. Ils se réfèrent : 1° Au spectre de cet antibiotique : Welch, Randall, Reedy et Kramer (*Antib. Chemotherapie*, 1952 **12**, 693) ; Higgens, Pittenger et McGuire (*Ibid.*, 1953, **3**, 50) ; Powell, Boniece, Pittenger, Stone et Culbertson (*Ibid.*, 1953, **3**, 165). Dans l'ensemble, ces travaux mettent en lumière la polyvalence du spectre *in vitro*, avec prédominance de l'effet bactériostatique à l'égard des germes Gram-positifs. Au surplus, celui de Powell et collab. a trait au même spectre *in vivo* et conclut que l'Ilotycine est active vis-à-vis des grands virus (méningo-pneumonie, typhus épidémique et lymphogranulomatose inguinale), mais inactive sur les petits virus (MM. Semliki, Forest, rage, poliomyélite et grippe) ; 2° Finland, Wilcox, Wright et Purcell (*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **81**, 725) envisagent la possibilité de la résistance microbienne acquise en milieux contenant l'Ilotycine, tandis que : 3° Josselin et Sylvester (*Antib. Chemotherap.*, 1953, **3**, 63), de même que Ziegler et McGuire (*Ibid.*, 1953, **3**, 67) étudient le problème de la pénétration de l'antibiotique dans la circulation sanguine.

ACTION COMBINÉE *IN VITRO* DE DIFFÉRENTS TUBERCULICIDES AVEC L'HYDRAZIDE DE L'ACIDE ISONICOTINIQUE (INH)

par M^{me} AÏTOFF (*.)

(Laboratoires Debat.)

Il y a à peu près un an que j'ai fait, ici-même, une communication sur la synergie possible des mélanges de différents tuberculicides avec l'INH [1, 2].

Ce que j'avais surtout voulu souligner c'est la *stabilisation* de l'action de l'INH qu'on obtient lorsqu'on le combine avec la plupart des tuberculicides classiques : PAS, Streptomycine, Dihydromycine, Tb1. Non seulement on arrive à diminuer plus ou moins les doses actives de chacun des composants, mais surtout le mélange devient *stable* et ne varie pas durant tout le mois que dure l'expérience, et même au delà.

C'est d'ailleurs devenu un lieu commun, sur lequel les cliniciens et les travailleurs de laboratoire sont d'accord, de ne jamais employer l'INH seul, si l'on veut éviter la résistance qui autrement apparaît très vite.

Rappelons incidemment que M. Coletsos [3], mettant en doute mes expériences, a affirmé que l'absence de synergie de l'INH avec tous les tuberculicides connus, était la plus grande déception de sa vie. Il a dû se consoler depuis, puisqu'il a confirmé en partie mes résultats six semaines après, à la Société de la Tuberculose.

L'expérimentation a toujours été faite en milieu Dubos liquide, qui permet de juger les résultats d'une manière précise, en constatant le développement de la culture dans le dernier tube trouble et son inhibition dans le premier tube limpide.

La lecture se faisait après trente jours de séjour à l'étuve, quand les résultats pouvaient être considérés comme stabilisés.

La souche employée était le H₃₇Rv en milieu Dubos, âgée de 10 à 15 jours.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 mars 1953.

Une cinquantaine de titrages m'ont donné en moyenne les chiffres suivants :

Limite d'inhibition pour INH employé seul.	1 μg au cm^3
Limite d'inhibition pour PAS employé seul.	22,5 μg
Limite d'inhibition pour Tb_1 employé seul.	20 μg
Limite d'inhibition pour streptomycine employée seule	0,5 μg

La combinaison INH et PAS a été employée dans 15 expériences à des taux de INH variant entre 0,2 p. 100 et 10 p. 100.

Le tableau I résume ces expériences :

TABLEAU I. — Combinaison INH et PAS
à des taux variant entre 0,2 p. 100 et 10 p. 100 d'INH

Limite de l'inhibition	Taux du mélange		Limite de l'inhibition
I.N.H.	I.N.H. + P.A.S.	P.A.S.	
0,032 μg	6 fois 1	o/o moyenne	3,2 μg
0,042 "	3 fois 0,5	o/o "	8,4 "
0,06 "	2 fois 2	o/o "	3,0 "
0,03 "	1 fois 0,66	o/o	4,5 "
0,4 "	1 fois 4	o/o	10,0 "
0,025 "	1 fois 10	o/o	0,25 "
0,05 "	1 fois 0,2	o/o	25,0 "
0,639 "			54,35 "
Moyenne sur 15 expériences 0,091 μg		Moyenne	7,76 "
Dose 11 fois moindre que I.N.H. seul		Dose 3 fois moindre que P.A.S. seul	

† Si l'on fait abstraction de la proportion aberrante de 0,2 p. 100 d'INH qui peut être considérée comme curiosité de laboratoire, on obtient sur 14 expériences une moyenne de 0,098 μg pour l'INH (soit 10 fois moindre que l'INH seul) et de : 4,3 μg pour le PAS, (soit 5 fois moindre que le PAS seul).

Ces chiffres nous montrent très nettement, à part la stabilisation de l'inhibition qui a une grande importance en clinique, la diminution importante des doses de chacune des substances employées.

L'action combinée de l'INH avec le Tb_1 (Thiosemicarbazone de l'aldéhyde para-acétyl aminobenzoïque) donne *in vitro* des résultats superposables à ceux constatés dans les combinaisons INH et PAS [1] et INH et Streptomycine [2].

Pour faire apparaître encore plus nettement l'action stabilisante et synergique des tuberculicides combinés à l'INH, je me suis servi d'une autre méthode.

TABLEAU II. — INH seul.

				1 goutte de culture de 15 jours.	6 JOURS	13 JOURS	16 JOURS	20 JOURS	24 JOURS	29 JOURS
1.	4 cm ³ Dubos à 4	μg INH.								
2.	—	0,5	—	—	—	—	±	++	++	++
3.	—	0,2	—	—	—	—	+	++	++	++
4.	—	0,1	—	—	—	±	+	++	++	++
5.	—	0,05	—	—	—	+	++	++	++	++
6.	—	0,02	—	—	—	++	++	++	++	++
7.	—	0,01	—	—	—	++	++	++	++	++
23.	—	0	—	—	++	++	++	++	++	++
24.	—	0	—	—	+	++	++	++	++	++

Après 29 jours d'étuve, inhibition complète à 1 μg.

TABLEAU III. — Tb₁ seul.

				1 goutte de culture en Dubos de 15 jours.	6 JOURS	13 JOURS	16 JOURS	20 JOURS	24 JOURS	29 JOURS
8.	4 cm ³ Dubos à 10	μg Tb ₁								
9.	—	5	—	—	—	—	+	±	++	++
10.	—	2	—	—	—	++	++	±	++	++
11.	—	1	—	—	—	++	++	±	++	++
12.	—	0,5	—	—	±	+	++	+	++	++
13.	—	0,2	—	—	±	++	++	++	++	++
14.	—	0,1	—	—	±	++	++	++	++	++
23.	—	0	—	—	±	++	++	++	++	++
24.	—	0	—	—	±	++	++	++	++	++

Après 24 jours d'étuve culture à 10 μg aussi abondante que dans le tube témoin.

J'ai associé une dose fixe insuffisante de l'un des produits à une dose variable également au-dessous de la dose inhibitive de l'autre, en déterminant la dilution limite qui provoque une inhibition complète de la culture microbienne.

Les expériences ont porté sur l'INH et la Streptomycine, l'INH et PAS, la Streptomycine + PAS et INH.

L'INH était employé à des doses variables, les autres produits à des doses fixes insuffisantes.

TABLEAU IV. — Mélange de 1 partie de INH et 20 Tb1.

						6 JOURS	13 JOURS	16 JOURS	20 JOURS	24 JOURS	29 JOURS
15.	4 cm ³ Dubos à 2,5	μg INH	et 50	Tb1 . .	1 goutte de culture en Dubos de 45 jours.	—	—	—	—	—	—
16.	—	1,25	—	25 — . .		—	—	—	—	—	—
17.	—	0,5	—	10 — . .		—	—	—	—	—	—
18.	—	0,25	—	5 — . .		—	—	—	—	—	—
19.	—	0,125	—	2,5 — . .		—	—	—	—	—	—
20.	—	0,05	—	1 — . .		—	—	—	—	—	—
21.	—	0,025	—	0,5 — . .		—	—	—	—	+	+
22.	—	0,0125	—	0,25 — . .		—	—	+	++	++	++
23.	—	0	—	0 — . .		±	++	++	++	++	++
24.	—	0	—	0 — . .		±	++	++	++	++	++

Synergie très nette. Après 29 jours d'étuve *inhibition complète* à 0,05 INH et 1 μ g Tb1, soit action à peu près vingt fois plus énergique.

A titre d'exemple, je donne le protocole de deux expériences dans les tableaux I et VI.

Les tubes impairs contiennent la combinaison des 2 produits, les tubes pairs l'INH seul aux doses correspondant à celles qui sont employées en combinaison.

Au bout de sept jours on voit déjà apparaître dans certains des tubes pairs, 10, 12, 14, une culture très nette, aussi bien que dans les tubes témoins et dans ceux qui ne contiennent que de la Streptomycine, tubes 15 et 16. Dans les jours qui suivent, les cultures se développent dans les autres tubes pairs successivement. Bientôt tous les tubes pairs qui ne contiennent que l'INH seul donnent une culture aussi riche que celle des tubes témoins. Les tubes impairs, au contraire, sont restés clairs jusqu'au 42^e jour, quand l'expérience a été arrêtée. Cette alternance des tubes clairs et troubles donne un aspect très démonstratif à l'expérience.

Le tableau VI représente la combinaison de 3 produits : 2 μg de PAS et 0,1 μg de Streptomycine à dose fixe, tandis que l'INH est à dose variable. Le principe est le même que dans le tableau précédent.

Dans ces deux tableaux nous voyons très nettement le même phénomène que celui que nous avons signalé précédemment.

D'une part une *stabilisation* de l'action de l'INH qui dure au delà d'un mois, d'autre part une diminution considérable des doses inhibitives de l'INH, lorsqu'il est combiné à la Streptomycine (tableau V) ou à la Streptomycine et au PAS (tableau VI).

TABLEAU V. — Combinaison : streptomycine 0, 2 μ g, dose fixe insuffisante et INH dose variable.

1	4cm ³	Dubos à 0,2 μ g Str.	et 0,5 μ g INH	7 j	13 j	20 j	25 j	30 j	42 j
1	"	0	0,5	"	-	-	-	-	-
2	"	0	0,5	"	-	-	-	+	++
3	"	0,2	" et 0,2	"	-	-	-	-	-
4	"	0	0,2	"	-	-	-	+	++
5	"	0,2	" et 0,1	"	-	-	-	-	-
6	"	0	0,1	"	-	-	+	+	++
7	"	0,2	" et 0,05	"	-	-	-	-	-
8	"	0	0,05	"	-	++	++	++	++
9	"	0,2	" et 0,02	"	-	-	-	-	-
10	"	0	0,02	"	+	++	++	++	++
11	"	0,2	" et 0,01	"	-	-	-	-	-
12	"	0	0,01	"	+	++	++	++	++
13	"	0,2	" et 0,005	"	-	-	-	-	-
14	"	0	0,005	"	+	++	++	++	++
15	"	0,2	" 0	"	+	+	+	+	++
16	"	0,2	" 0	"	+	+	+	+	++
17	"	0	0	"	+	++	++	++	++
18	"	0	0	"	+	++	++	++	++

Le tube 13 qui reste clair dans les 2 tableaux, pendant toute la durée de l'expérience, contient la dose infime de 0,005 μ g d'INH, soit 1 : 200 000 000. Elle suffit à arrêter le développement de la culture. (Cette dose est cent à deux cents fois plus faible que la dose inhibitive de l'INH seul.)

Les tubes 19 et 20 du tableau VI qui ne contiennent que de la Streptomycine aux doses employées en combinaison avec l'INH n'inhibent pas la culture, qui apparaît presque dans les mêmes délais que dans les tubes témoins.

Il en est de même pour le PAS seul (tubes 17 et 18) ou combiné à la Streptomycine (tubes 15 et 16).

En résumé, l'INH employé seul *in vitro* possède un pouvoir inhibitif qui, très rapidement, diminue d'intensité et provoque la résistance du bacille tuberculeux. Au contraire, l'action inhibitive des différents tuberculicides combinés à l'INH stabilise cette inhibition tout en permettant de diminuer la quantité de chacun des produits employés.

MISE EN ÉVIDENCE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE DU VIRUS DE LA POLYÉDRIE DE *PLUSIA GAMMA* L. (LEPIDOPTERA)

par P. LÉPINE, C. VAGO et O. CROISSANT.

(Service des Virus de l'Institut Pasteur
et Laboratoire de Pathologie
de la Station de Recherches Séricicoles d'Alès).

Au cours des examens pathologiques des larves du lépidoptère *Plusia gamma* L., l'un de nous a récemment caractérisé une maladie infectieuse causant une mortalité très importante de cet insecte, aussi bien dans la nature que dans les élevages.

L'histologie pathologique et la transmission par filtrats ayant révélé une maladie à ultravirus du type polyédrie, nous nous sommes proposé de mettre en évidence le virus et d'en étudier la morphologie par examen au microscope électronique.

TECHNIQUE. — Pour faciliter l'obtention du virus sous une forme rassemblée, nous avons utilisé la méthode de libération directe de celui-ci à partir des polyèdres, ou bien examiné les filtrats et le culot de centrifugation.

Une chenille du cinquième âge arrivée à un stade avancé de la polyédrie expérimentale est broyée au mortier dans une quantité très faible d'eau distillée. Après vérification microscopique de la présence d'un grand nombre de polyèdres, le broyat est centrifugé à petite vitesse (1 450 tours/minute pendant trois minutes). Le liquide surnageant est alors centrifugé à 4 000 tours/minute pendant quinze minutes et le culot lavé trois fois à l'eau distillée, puis finalement remis en suspension dans un volume d'eau distillée égal au volume initial. Après décantation, on procède au prélèvement du liquide surnageant. Cette méthode permet d'obtenir des polyèdres qui sont sensiblement de même taille. Ceux que nous avons recueillis avaient des diamètres s'échelonnant de 825 m μ à 1 μ . Une microgoutte de la suspension ainsi obtenue est déposée sur des grilles porte-objet de microscope électronique, préalablement recouvertes d'une membrane en Formvar. Avant complète dessiccation de la goutte, les grilles sont mises à flotter sur une solution servant à traiter

les polyèdres. Nous avons opéré avec deux types de solutions alcalines ; l'une, solution de NaOH à 4 pour dix mille ; l'autre, solution de CO_3Na_2 à 3,2 pour mille. On laisse la solution agir sur le matériel pendant une minute, dix minutes, quinze minutes, trente minutes, quarante-cinq minutes, une heure et une heure trente. (Signalons ici que l'essai, dans les mêmes conditions, de solutions de NaCl à une concentration de 3,2 pour mille a donné des résultats négatifs.)

Après ces différents temps, les préparations sont transférées dans l'eau distillée où elles sont soigneusement lavées puis séchées et enfin métallisées à l'or-palladium avant examen au microscope électronique. Nous soulignons, compte tenu des observations de Hughes [2], que les polyèdres ont été ainsi traités vingt-quatre heures après broyage de la chenille et que les solutions étaient préparées quatre-vingt-seize heures avant l'emploi.

RÉSULTATS. — Les préparations témoins, non traitées à l'hydroxyde de sodium ou au carbonate de sodium, montrent des masses isolées ayant l'aspect général et la taille de corps d'inclusion constitués par des polyèdres. Au microscope électronique, leur aspect apparaît très opaque ; leurs formes sont assez régulières avec un aspect très minéral et une distribution des arêtes mettant en relief la forme plutôt tétragonale de ces éléments. Ces divers caractères confirment ce qui a déjà été noté au cours des examens histologiques [6].

Le traitement de courte durée avec la solution de NaOH (une minute) provoque une désintégration déjà prononcée des polyèdres. Ces derniers présentent une structure granuleuse incomparablement plus perméable aux électrons que les polyèdres non traités et permettent de mettre en relief la forme des particules de virus incluses. Un traitement plus long (quinze minutes) dégage encore davantage les corps élémentaires d'aspect bacilli-forme qui, selon les polyèdres, restent accumulés au milieu de la structure granulaire devenue très transparente, ou sont libérés et dispersés sur le champ microscopique, la périphérie du polyèdre prenant l'aspect d'une membrane ou d'un sac vidé et affaissé. Le traitement pendant trente minutes augmente le nombre des particules de virus libres.

Le traitement au CO_3Na_2 provoque une désintégration des polyèdres et une libération des éléments virulents comparables à celles obtenues avec NaOH. Cependant la désintégration est moins homogène et les contours des ultravirus semblent quelquefois « fondus » et déformés. Nous remarquons qu'un traitement long (trente minutes) au CO_3Na_2 donne naissance à des éléments semblant creusés ou vidés à l'intérieur.

La désintégration des polyèdres met en évidence des éléments

correspondants à ceux décrits dans d'autres polyédries comme agrégats de virus [1, 3]. Ils sont bacilliformes ou ovoïdes, allongés et ont les deux extrémités arrondies. L'ombrage montre nettement qu'ils n'ont pas toujours le même diamètre tout le long du corps, et qu'ils présentent parfois des extrémités arrondies et élargies « en biscuit à la cuiller ». Les mensurations faites sur de nombreux éléments déterminent la longueur (280 à 380 m μ), la largeur (100 m μ) et montrent en même temps une uniformité de ces éléments entre eux quant à leur forme et leurs dimensions.

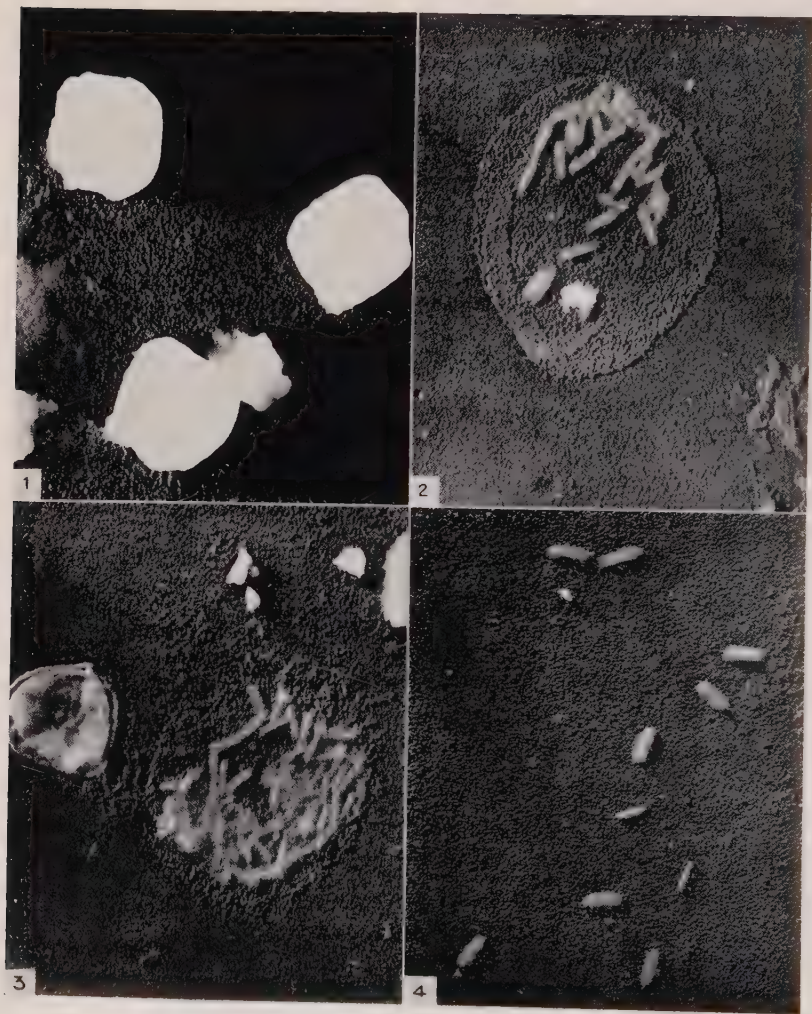
En dehors de ces éléments, on en observe d'autres pouvant être comparés aux particules individuelles de virus. Ceux-ci ont la forme de bâtonnets droits, aux extrémités rectangulaires. Leur longueur est de l'ordre de 250 m μ , c'est-à-dire qu'ils sont légèrement plus courts que les éléments précédents. Leur largeur étant de 60 m μ environ, ils semblent donc être moins étroits que les virus individuels des polyédries en général. Nous remarquons que même les traitements allant jusqu'à trente minutes, aussi bien avec NaOH qu'avec CO₃Na₂ n'ont pas donné naissance à des éléments plus minces. D'autre part, nous n'avons pas observé sur les virus d'indices pouvant suggérer une divisibilité longitudinale plus poussée. Nous nous proposons, en dehors de l'emploi d'autres procédés de désagrégation, de faire également une étude comparative avec les virus de certaines granuloses [5].

En ce qui concerne les rapports morphologiques entre les corps polyédriques et les ultravirus, nous constatons que les éléments restant à l'intérieur des polyèdres sont du type « agrégats », ce qui montre que les virus à forme de bâtonnets ne s'incorporent pas directement. Le nombre des éléments en « agrégats » enfermés dans un polyèdre varie selon les polyèdres ; il est, en moyenne, de l'ordre de 40 à 60.

Ces propriétés morphologiques du virus et des corps d'inclusion ainsi que leurs rapports, permettent de classer cet ultravirus parmi les *Borrelina*. Nous proposons la dénomination de *B. plusiae* n. sp., les caractéristiques concernant la pathogénie, la transmission et la spécificité signalées précédemment [6] ayant satisfait les autres points de vue de ce classement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. BERGOLD, *Zeit. angew. Entomologie*, 1951, **33**, 267.
- [2] K. M. HUGHES, *J. Bact.*, 1950, **59**, 189.
- [3] K. M. SMITH et R. W. G. WYCKOFF, *Research*, 1951, **4**, 148.
- [4] E. A. STEINHAUS, *Bact. Rev.*, 1949, **13**, 203.
- [5] E. A. STEINHAUS, K. M. HUGHES et H. B. WASSER, *J. Bact.*, 1949, **57**, 219.
- [6] C. VAGO et R. CAYROL. (à paraître).



LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Polyèdres non traités. Gross. : $\times 15\ 750$.

FIG. 2 et 3. — Polyèdres traités par NaOH (sol. à 4 : 10 000) pendant une minute. Gross. : $\times 15\ 750$.

FIG. 4. — Polyèdres traités par NaOH (sol. à 4 : 10 000) pendant quinze minutes. Gross. : $\times 15\ 750$.

UN APPAREIL SIMPLE POUR LE DOSAGE DES RAYONNEMENTS ULTRAVIOLETS ÉMIS PAR LES LAMPES GERMICIDES

par RAYMOND LATARJET, PIERRE MORENNE et ROGER BERGER.

(Institut Pasteur. Service de Radiologie et Cancérologie.)

L'utilisation rationnelle d'une source de radiations exige un dosage précis du rayonnement émis. Ce dosage s'impose aujourd'hui à l'égard des lampes à vapeur de mercure à basse pression, dites « lampes germicides », dont l'usage se répand, tant pour des travaux de recherche que pour des applications industrielles. Si l'on veut comparer des résultats obtenus dans des circonstances différentes, si l'on veut réaliser des installations adéquates et s'assurer de leur stabilité, si l'on veut enfin éviter les inconvénients et accidents légers consécutifs à des surexpositions, il devient nécessaire de mesurer les doses de rayons UV que l'on administre. Or, à l'heure actuelle, ces mesures sont rarement pratiquées.

Le dosage des rayons UV en vue d'applications biologiques soulève de grandes difficultés dues à ce que les diverses radiations, différemment absorbées par les molécules mises en jeu dans l'objet irradié, présentent des efficacités individuelles différentes. Pour exprimer une « dose » de rayonnement administrée à une préparation, il ne suffit donc pas de mesurer l'énergie radiante totale fournie ; il faut connaître encore la part que chaque radiation prend dans le total, et évaluer cette part en fonction de l'efficacité individuelle correspondante. Il s'agit d'un problème de spectrophotométrie UV dont les bases ne sont pas encore toutes posées, et dont la solution pratique exige un appareillage complexe et délicat [4. 5]. Ce problème se pose avec toutes ses difficultés lorsqu'on utilise les lampes à vapeur de mercure à pression élevée (lampes chaudes), dans lesquelles, l'atome de mercure se trouvant excité et porté à des niveaux très divers, le spectre émis comprend de nombreuses radiations UV intenses. Mais il se simplifie considérablement pour les lampes germicides (lampes froides) chez lesquelles la quantité du mercure introduit dans le tube de décharge est réduite de telle sorte qu'après vaporisation totale, la pression de la vapeur n'excède pas 10^{-4}

atmosphère. Dans ces conditions, la puissance consommée restant faible, la plupart des électrons de la décharge ont une énergie faible, inférieure au premier potentiel d'ionisation du mercure. L'excitation de l'atome se fait surtout au niveau le plus bas (4,87 eV), en sorte que la majeure partie de l'émission se localise dans la radiation de résonance correspondante, soit λ : 2537 Å, dont la prédominance est d'autant plus grande que le courant de décharge est plus bas. Cette émission est toujours accompagnée d'une émission notable de la radiation λ 1849 Å correspondant au second potentiel d'excitation 6,67 eV de l'atome neutre de mercure, radiation dont la présence se reconnaît à l'odeur de l'ozone qu'elle forme dans l'air ambiant. Dans les lampes commerciales actuelles, on élimine λ 1849 par un verre spécial laissant passer 80 à 90 p. 100 de λ 2537. Cette radiation transporte alors à elle seule plus de 90 p. 100 de l'énergie émise par la lampe sous forme de rayons UV, et représente jusqu'à 35 p. 100 de la puissance consommée par la lampe. Comme par ailleurs elle se trouve voisine du maximum d'absorption des acides nucléiques, c'est-à-dire que son efficacité est proche du maximum, elle entraîne à elle seule 98 p. 100 environ de l'action germicide du rayonnement total de la lampe. Du point de vue germicide, on se trouve donc en présence d'un rayonnement pratiquement monochromatique dont le dosage se trouve, de ce fait très simplifié. Toutefois, outre cette radiation UV prédominante, les lampes germicides émettent des radiations non germicides visibles et infrarouges, dont l'intensité relative, non négligeable, est d'autant plus grande que la puissance de la lampe est plus grande, radiations que l'on devra éliminer lorsqu'on dosera la première.

I. — PRINCIPE DU DOSIMÈTRE.

Le moyen le plus simple d'éliminer les radiations indésirables, visibles et infrarouges, consiste à utiliser comme récepteur une photocellule dont le seuil spectral siège dans l'ultraviolet. De nombreuses cathodes (cadmium, magnésium, tantale, etc.) satisfont à cette condition, et ont permis d'établir des dosimètres satisfaisants [3]. Mais la faible sensibilité de ces cellules oblige, dans le cas présent, à leur adjoindre un amplificateur de courant continu. Pour éviter les inconvénients inhérents à cette amplification, on peut utiliser une cellule à couche d'arrêt au sélénium, très sensible aux radiations visibles, à condition de la sensibiliser à λ 2537 par une substance fluorescente appropriée.

Cette cellule est suffisamment sensible pour donner ici une réponse électrique mesurable par un appareil portatif à lecture directe (microampèremètre). Lorsqu'on l'utilise dans des conditions convenables d'éclairement et de température, elle est stable,

et sa réponse est fonction sensiblement linéaire du flux qu'elle reçoit.

La substance fluorescente doit être stable, inerte, et excitable par λ 2537 avec un rendement élevé ; elle doit émettre un rayonnement dont la couleur correspond à une région spectrale où la cellule au sélénium présente une sensibilité aussi élevée que possible. La willémite, ou orthosilicate de zinc, activée par du manganite de baryum [4] répond à ces qualités : son rendement de fluorescence est maximum à λ 2520 Å, nul au-dessus de 3400 Å (fig. 3) et sa fluorescence verte (fig. 3) correspond au maximum spectral de sensibilité du sélénium (fig. 2).

Aussi n'est-il pas étonnant que l'on ait proposé à diverses reprises de mesurer l'ultraviolet germicide au moyen d'un récep-

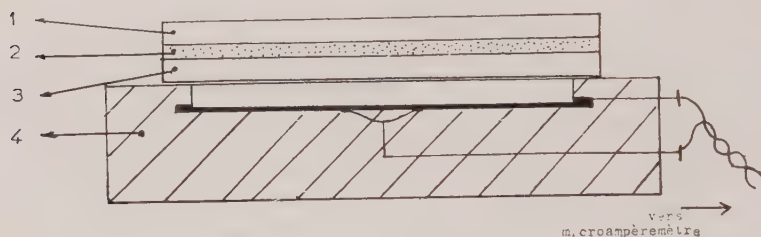


FIG. 1. — Schéma du dosimètre. 1, filtre « Corning » 9863 ; 2, Willémite ; 3, filtre « Katathermic » ; 4, cellule au sélénium.

teur essentiellement constitué par une cellule au sélénium recouverte de willémite. Dès 1940, Luckiesh et Taylor [8] proposaient un tel récepteur lié à un microampèremètre. Pour éliminer la réponse due aux radiations visibles et infrarouges, on procédait à deux lectures successives, l'une enregistrant le rayonnement total, et l'autre supprimant l'ultraviolet par une lame de verre, d'où, par différence, la réponse correspondant à l'ultraviolet seul. Indépendamment, Déjardin et Latarjet étudiaient un dispositif analogue [2]. Ces deux appareils ont l'inconvénient sérieux d'être sensibles aux radiations visibles et infrarouges.

Nous avons obvié à cet inconvénient en mettant au point l'appareil dont la figure 1 donne le schéma. La cellule au sélénium est recouverte d'un verre opaque dans l'infrarouge et parfaitement transparent dans le visible (verre Katathermic de Bagneaux). Sur la surface supérieure de ce verre est déposée une couche de willémite finement pulvérisée liée par un film de colloïdion de manière à former une couche uniforme ; on a choisi l'épaisseur minimum qui absorbe totalement le rayonnement UV incident. Cette couche est maintenue par l'application étroite

d'un second verre opaque dans le visible et présentant une transparence satisfaisante à l'égard de λ 2537. On peut utiliser, soit un verre UG5 de Schott, soit comme nous l'avons fait, un Corning 9863. Ainsi, le rayonnement total incident rencontre d'abord le filtre Corning qui arrête les radiations visibles et laisse passer l'UV et une bande infrarouge ; l'UV frappe la couche de willémité qui le transforme en lumière verte, laquelle traverse le second verre qui arrête l'infrarouge. Finalement la cellule n'est frappée que par la lumière verte provenant de la radiation UV, tandis que les radiations visibles et infrarouges sont successivement éliminées (1). Ce récepteur est relié directement à un microampèremètre à courant continu ayant une résistance intérieure de l'ordre de 2 000 ohms, et dont la sensibilité correspond à une déviation totale de l'aiguille sur l'échelle pour un courant d'environ 5 microampères.

II. — ÉTUDE OPTIQUE DU DOSIMÈTRE.

Nous avons procédé d'abord à une étude optique des divers organes de l'appareil.

a) LA CELLULE. — La courbe spectrale de sensibilité du récepteur (fig. 2, courbe A) a été déterminée en utilisant un monochromateur de Leiss à optique de quartz, une lampe à filament de tungstène et une lampe à hydrogène. Une étude préalable nous avait fourni les caractéristiques optiques (dispersion et transmission) du monochromateur, et les caractéristiques d'émission des deux sources dans le domaine spectral exploré (2 000-12 000 Å).

b) LE FILTRE CORNING 9863. — La courbe spectrale de transmission de ce filtre (fig. 2, courbe B) a été déterminée au spectrophotomètre Beckman. Elle montre une transmission satisfaisante d'environ 0,5 pour λ 2537 Å, une excellente opacité à l'égard des radiations visibles, et une forte bande de transmission dans le proche infrarouge.

c) LE VERRE KATATHERMIC. — Cette bande impose l'emploi d'un second filtre transparent aux radiations vertes et jaunes émises par la couche fluorescente, et aussi opaque que possible dans le proche infrarouge. La courbe C de la figure 2 montre la transmission spectrale du verre Katathermic que nous avons utilisé dans ce but.

(1) Un dispositif analogue, utilisant une cellule à l'oxyde de cuivre, vient d'être mis au point en Allemagne. (Voir *Strahlentherapie* 1952, 88, 544).

Finalement, la combinaison Corning 9863-Katathermic donne un résultat satisfaisant, à savoir une transmission de l'ordre de 0,5 pour λ 2537 Å à la sortie du premier verre, c'est-à-dire au niveau de la couche fluorescente, suivie d'une transmission très élevée (0,8) par les radiations de fluorescence, tandis que l'ensemble est pratiquement opaque aux radiations visibles et infrarouges qui accompagnent toujours le rayonnement UV que l'on se propose de mesurer.

Il reste toutefois deux faibles bandes, l'une vers 3900 Å,

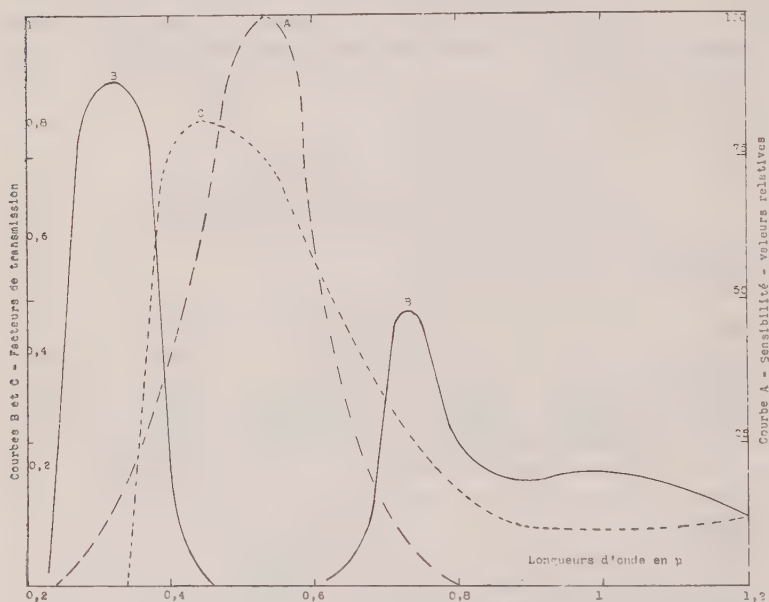


FIG. 2. — Courbes spectrales : A, sensibilité de la cellule au sélénium; B, transmission du verre Corning 9863; C, transmission du verre Katathermic.

l'autre vers 7000 Å correspondant respectivement à des transmissions de 0,004 et 0,007 qui suffisent à entraîner une réponse électrique notable, d'ailleurs facile à contrôler, lorsqu'on expose l'appareil à une lumière intense. En revanche, la réponse reste insignifiante à l'égard d'un éclairage modéré, notamment à l'égard des radiations visibles et infrarouges émises par les lampes germicides, ce qui comporte un double avantage : celui de doser le rayonnement ultraviolet par une mesure directe et non plus par différence, et celui de pouvoir opérer dans un local modérément éclairé, sans faire l'obscurité. Une transmission plus exclusive encore de la bande de fluorescence serait assurée en

remplaçant le verre Katathermic par un filtre interférentiel convenablement choisi. Cette solution a dû être abandonnée pour deux raisons. En premier lieu, la transmission maximum de ce filtre est trop faible, en sorte que le dosimètre ne possède alors plus une sensibilité suffisante pour être utilisable avec un micro-ampèremètre ordinaire. En second lieu, la position spectrale de la bande de transmission varie avec l'incidence des rayons. L'éta-

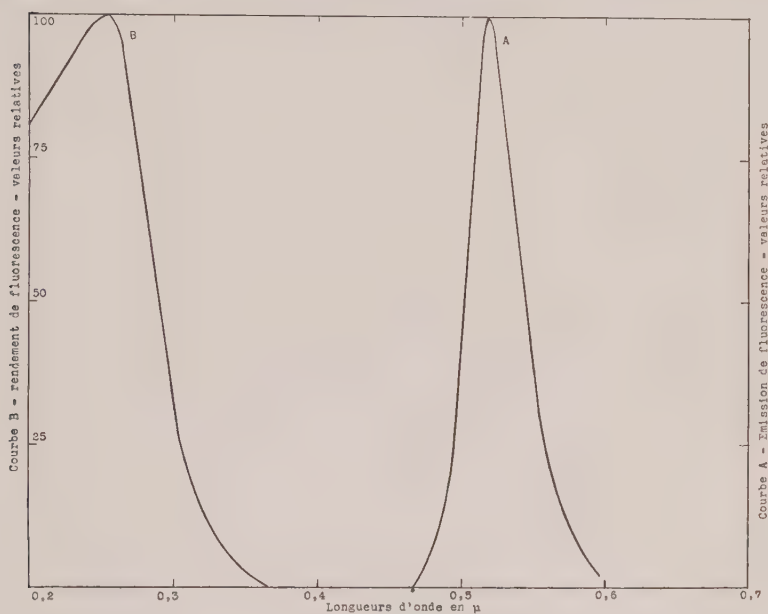


Fig. 3. — Courbes spectrales : A, distribution de l'énergie dans le rayonnement de fluorescence de la willémite; B, rendement de fluorescence de la willémite.

lonnage du dosimètre ne serait alors valable que pour une incidence donnée. Or, l'un des avantages que l'on peut demander à cet appareil est précisément de mesurer des flux sous diverses incidences.

d) LA COUCHE FLOUESCENTE. — Nous avons déterminé d'abord la composition spectrale du rayonnement de fluorescence de la willémite (fig. 3, courbe A), en projetant ce rayonnement sur la fenêtre d'entrée d'un puissant monochromateur double à optique de verre, et en utilisant comme récepteur un multiplicateur d'électrons dont la sensibilité spectrale avait été préalablement déterminée. On notera (fig. 2 A et 3 A) que la lumière de fluores-

cence correspond dans le spectre au maximum de sensibilité de la cellule au sélénium.

Nous avons ensuite mesuré le rendement de fluorescence de notre couche de willémite entre 2000 et 4000 Å (fig. 3, courbe B). L'excitation prend naissance vers 3400 Å, reste très faible jusque vers 3000 Å, puis s'élève rapidement pour atteindre son maximum à 2520 Å où le rendement absolu atteint 5,3 p. 100. À partir de là, le rendement quantique de fluorescence reste constant, ainsi

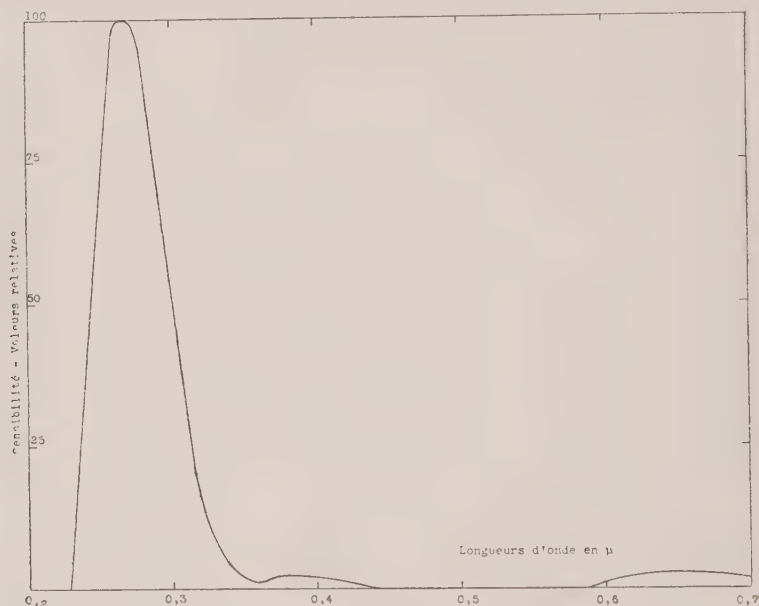


FIG. 4. — Courbe spectrale de sensibilité du dosimètre.

qu'on pouvait s'y attendre, la courbe devenant une droite passant par l'origine des longueurs d'onde.

e) DOSIMÈTRE COMPLET. — Nous avons enfin déterminé directement la courbe spectrale de sensibilité de l'appareil complet. Cette courbe (fig. 4) montre clairement la grande sensibilité de l'appareil dans le domaine des rayons ultraviolets, et l'absence presque totale de sensibilité à l'égard des radiations étrangères à ce domaine.

III. — ETALONNAGE EN UNITÉS ÉNERGÉTIQUES.

Les éclairagements énergétiques usuels que l'on est appelé à mesurer s'échelonnent entre 10 et 1 000 $\mu\text{watts cm}^{-2}$ (λ 2537).

L'appareil ainsi constitué donne, pour un éclairement de $200 \mu\text{watts cm}^{-2}$, un courant photoélectrique de 5 à 10 $\mu\text{ampères}$, soit la déflexion totale de l'aiguille d'un microampèremètre portatif ayant une résistance intérieure de l'ordre de 2 000 ohms. Une étude préliminaire a montré que si l'on ne dépasse pas la valeur précédente de $200 \mu\text{watts cm}^{-2}$, correspondant à la pleine sensibilité de l'appareil de mesure, le courant photoélectrique varie quasi linéairement avec l'éclairement, et la cellule ne manifeste pas de fatigue pendant la durée d'une lecture normale. On a donc avantage à ne pas dépasser cette valeur de l'éclairement. Pour les valeurs plus élevées, telles qu'on en observe à courte distance des sources, on diaphragmera l'ouverture du dosimètre dans un rapport connu (1/5). Enfin, pour des éclairements très faibles à grande distance des sources, on fera une mesure à distance moindre et l'on appliquera la loi de l'inverse carré, laquelle joue pratiquement pour les distances supérieures à la plus grande dimension de la source.

Etant donné la résistance intérieure élevée de la cellule, qui est d'environ 2 800 ohms, la sensibilité du dispositif diminue peu lorsque la résistance du circuit de mesure s'élève jusqu'à quelques milliers d'ohms. La figure 5 donne les courbes d'étalonnage d'un même dosimètre pour trois circuits de mesure dont les résistances sont respectivement 100, 1 000 et 3 000 ohms. Ceci permet d'utiliser des microampèremètres portatifs de type courant.

Pour calibrer un dosimètre en unités énergétiques, nous avons calibré d'abord une lampe germicide de référence qui nous sert depuis lors d'étalon primaire. A cet effet nous avons utilisé trois sources dont l'émission nous était connue quant à la distribution spectrale et aux valeurs absolues de l'énergie, à savoir : une lampe à filament de carbone étalon du Bureau of Standards de Washington, un corps noir constitué par une petite ouverture pratiquée dans la paroi d'un four de grand volume et de température connue (2), enfin une puissante lampe à vapeur de mercure à pression moyenne précédemment étalonnée par l'un de nous [6]. Ces sources ont permis l'étalonnage précis d'une thermopile au moyen de laquelle les radiations UV les plus intenses, et en particulier λ 2537, provenant de la lampe UV à pression moyenne étalon ont été mesurées à la sortie d'un monochromateur. Cette mesure a fourni la transmission de cet appareil pour λ 2537 dans des conditions géométriques données du faisceau. Au moyen d'un récepteur plus sensible (cellule photoélectrique au potassium hydruré recouverte d'une couche

(2) Ce corps noir a été aimablement mis à notre disposition par le Laboratoire de Recherches de la Société du Gaz de France, dont nous remercions le directeur, M. Gouffé.

de salicylate de sodium, *cf.* [4]), nous avons alors comparé, à la sortie du monochromateur, les intensités de la raie 2537 Å données par la lampe précédente et par la lampe germicide disposées dans les mêmes conditions géométriques. D'où l'on a déduit l'éclairement énergétique au niveau de la fente d'entrée du monochromateur. Finalement, notre lampe germicide étalon donne, à une distance de 1 m, un éclairement énergétique égal à :

$$80 \pm 4 \text{ } \mu\text{watts cm}^{-2} \text{ (}, 2537 \text{ Å).}$$

Cette source a ensuite permis d'étalonner le dosimètre et de

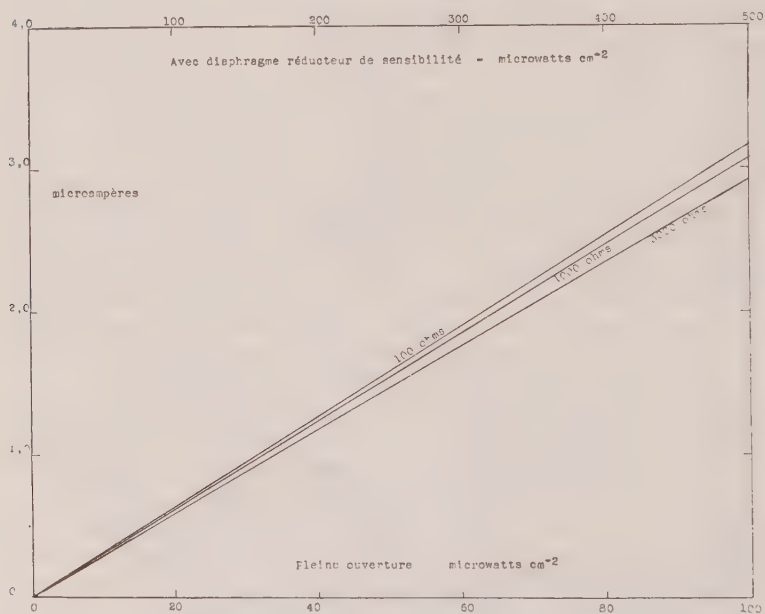


FIG. 5. — Fiche d'étalonnage du dosimètre en unités énergétiques.

joindre à celui-ci une « fiche d'étalonnage » donnant l'éclairement énergétique en fonction du courant photoélectrique exprimé en μ ampères (fig. 5).

Si l'appareil est utilisé correctement (faible débit, température ordinaire, absence d'humidité, propreté du verre Corning servant de fenêtre, absence de solarisation de ce verre), l'étalonnage précédent semble devoir rester valable pendant longtemps. En effet, l'étalonnage d'un appareil de ce genre mis en service dans notre laboratoire n'a pas varié au cours d'une année d'utilisation quasi quotidienne.

IV. — UN TEST BIOLOGIQUE.

Il peut être utile de disposer d'un test biologique fournissant une réponse quantitative à un rayonnement germicide. En l'absence de dosimètre, ce test peut permettre d'évaluer approximativement l'intensité du rayonnement qu'on utilise ; par ailleurs, il peut servir de garde-fou contre les écarts imprévus d'un dosimètre détérioré.

De tous les tests connus, le plus simple et le plus sûr est fourni

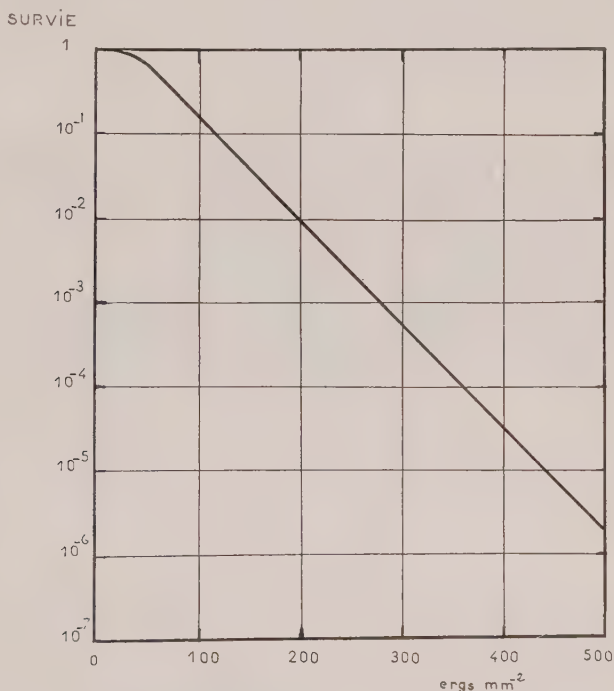


FIG. 6. — Courbe d'inactivation des bactériophages T2 et C16 par la radiation 2537 Å.

par l'inactivation d'un bactériophage. Les phages sont très stables au cours des années ; dans des conditions données d'entretien, ils présentent une sensibilité très constante aux rayons UV ; enfin, la détermination de leur activité est favorable à des mesures quantitatives précises. La figure 6 donne la courbe de survie du phage T2, actif sur *E. coli*, souche B, irradié en suspension dans l'eau bidistillée. Cette courbe représente la moyenne de plusieurs expériences concordantes effectuées dans

des conditions de dosage spécialement rigoureuses. On peut considérer qu'à ∓ 5 p. 100 près :

Au taux de survie de 10^{-2} correspond une dose de 200 ergs mm^{-2} } pour λ
 Au taux de survie de 10^{-4} correspond une dose de 360 ergs mm^{-2} } 2537 Å.

Le phage C16 actif sur *B. dysenteriae* Flexner, souche Y6R, donne exactement les mêmes résultats.

On remarquera que les résultats antérieurs de Latarjet et Wahl [7] sur C16 (220 ergs mm^{-2} pour une survie de 10^{-2}) et de Luria et Latarjet [9] sur T2 (230 ergs mm^{-2} pour une survie de 10^{-2}) concordent bien avec la présente figure établie dans des conditions plus sûres.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. C. BEESE. *J. Opt. Soc. Amer.*, 1939, **29**, 278.
- [2] G. DÉJARDIN et R. LATARJET. *Rev. gén. Electr.*, 1944, **53**, 281.
- [3] L. R. KOLLER et A. H. TAYLOR. *J. Opt. Soc. Amer.*, 1935, **25**, 184.
- [4] R. LATARJET. *Le dosage des rayonnements ultraviolets utilisés en thérapeutique*. Thèse Paris 1937.
- [5] R. LATARJET. *Cahiers de Physique*, 1944, **23**, 57.
- [6] R. LATARJET. *J. de Physique*, 1939, **10**, 120.
- [7] R. LATARJET et R. WAHL. *Ces Annales*, 1945, **71**, 336.
- [8] M. LUCKIESH et A. H. TAYLOR. *Rev. Sc. Instr.*, 1940, **11**, 110.
- [9] S. E. LURIA et R. LATARJET. *J. Bact.*, 1947, **53**, 149.

INCIDENCE DES TYPES BIOCHIMIQUES PARMI LES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES DE *SALMONELLA TYPHI*

Par MARIE PAVLATOU et PIERRE NICOLLE (*).

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage.)

INTRODUCTION.

Les méthodes qui permettent de diviser une espèce bactérienne en types au moyen d'une série de bactériophages appropriés (lysotypie ou phage typing) sont aujourd'hui de plus en plus utilisées. Elles sont appliquées couramment aux staphylocoques, aux streptocoques, à certaines *Shigella* (*Sh. sonnei*), aux bacilles diphtériques et à plusieurs *Salmonella*. Chez ces dernières, les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec les espèces *S. typhi* et *S. paratyphi* B.

Pour *S. typhi*, qui nous intéresse seule ici, on emploie des phages spécifiques de l'antigène Vi (phages Vi). Sont donc caractérisables exclusivement les cultures qui contiennent ce facteur (méthode de Craigie et Yen, 1938, complétée par Craigie et Felix, 1947).

Actuellement, on sait reconnaître 29 lysotypes parmi les bacilles typhiques (A, B₁, B₂, B₃, C, D₁, D₂, D₄, D₅, D₆, E₁, E₂, F₁, F₂, G, H, J, K, L₁, L₂, M, N, O, T, 25, 26, 27, 28 et 29] (1).

A de très rares exceptions près, ces types bactériophagiques (lysotypes) sont stables : chez un malade ou chez un porteur de germes, pendant toute la durée de la maladie, de la convalescence et du portage, les bacilles isolés appartiennent au même type, de même que les bacilles obtenus dans tous les cas qui reconnaissent une origine commune.

Cette stabilité confère à la lysotypie une valeur diagnostique

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 mai 1953.

(1) Au moment de la correction des épreuves, nous apprenons du Dr Felix que trois nouveaux lysotypes de *S. typhi*, les types 30, 31 et 32, seront proposés au Comité de la Lysotypie des Bacilles typhiques et paratyphiques B qui doit se réunir pendant le Congrès International de Microbiologie en septembre 1953 à Rome.

certaine et un incontestable intérêt en épidémiologie. Cette méthode permet aussi bien le dépistage des sources de contamination que l'étude de l'évolution des épidémies et des endémies typhoïdiques dans une région, dans un pays, et même sur tout un continent.

LES LIMITES DE LA LYSOTYPIE.

Lorsque les types de *S. typhi* présents dans un pays sont variés et suffisamment bien répartis, la lysotypie de Craigie et Felix peut rendre de grands services. Ces conditions idéales ne se rencontrent malheureusement pas toujours. Dans de nombreux pays, sur une quinzaine de types en présence, l'un d'entre eux est prédominant : le type A en Angleterre (Felix 1950), le type C en France en 1949-1950 (Nicolle et Jude, 1951), le type E₁ en Italie (de Blasi et Buogo, 1952), en Afrique du Nord, aux Etats-Unis, etc., le type F₁ en Iran, le type T en Turquie (Nicolle, Hamon et Edlinger, 1953).

Dans d'autres régions, les types sont très peu nombreux (2 ou 3) : A et C en Israël (Olitzki et collab., 1948), A et E₁ en Afrique noire, souvent avec une nette prédominance de l'un d'eux : E₁ dans l'ouest du Congo Belge, A dans l'est de cette colonie (van Oye et Nicolle, 1953), et au Cameroun.

Cette répartition très inégale des types dans certains pays offre un grand intérêt théorique du point de vue de l'épidémiologie générale. Il faut reconnaître, en revanche, qu'elle ôte à la lysotypie une grande partie de son intérêt pratique : la rencontre, chez des malades vivant en voisinage, d'un type exclusif ou fortement prédominant dans la région ne prouve nullement qu'ils se sont contaminés entre eux ou qu'ils ont contracté l'infection à la même source.

Pour que la lysotypie retrouve toute sa signification, il faut que la chance se mêle de fournir, chez les malades suspects de s'être contaminés au même foyer, des bacilles d'un type rare — ce qui autorise à affirmer la communauté de contagion — ou bien encore que certains individus éliminent un bacille du type prépondérant et d'autres un bacille d'un type rare — ce qui exclut toute relation épidémique entre les deux groupes de cas.

Ces éventualités favorables sont évidemment d'autant plus rares que la prédominance d'un type sur les autres est plus marquée dans le pays.

D'autre part, dans l'état actuel de la méthode, un certain nombre de cultures Vi positives, variables suivant les pays (de 5 à 15 p. 100, et quelquefois davantage) ne sont sensibles à aucun des phages utilisés pour la lysotypie. Ces cultures non caractérisables sont cependant lysées, dans la très grande majorité des cas, par les phages Vi I et IV employés pour le contrôle de leur

état Vi. Elles forment un groupe qui se comporte comme un véritable type. Il en a la stabilité et la constance, donc la valeur. Parfois même, il a lui aussi l'inconvénient d'être trop fréquent. Plusieurs auteurs le désignent sous le nom de groupe I + IV, laissant ainsi sous-entendre qu'il est formé de quelques types pour lesquels on ne possède pas actuellement de phages spécifiques.

ESSAIS D'AMÉLIORATION DE LA LYSOTYPIC DE « *S. TYPHI* ».

Pour remédier aux inconvénients dus au manque de diversité ou à la distribution disproportionnée des types dans certaines régions, il a été proposé d'adjoindre à la lysotypie deux sortes d'épreuves complémentaires : la recherche des différences de sensibilité à un phage ou à une série de phages, Vi ou non Vi, et la recherche des différences du pouvoir fermentaire, parmi les cultures appartenant à un même type.

Nous laisserons de côté les lysotypies auxiliaires (Nicolle, Pavlatou et Diverneau, 1953), qui doivent faire l'objet d'un mémoire prochain dans ces *Annales*, pour consacrer le présent travail à la démonstration du gain appréciable de précision qu'on obtient souvent lorsqu'on complète la lysotypie classique par la détermination des caractères biochimiques des cultures.

LES TYPES BIOCHIMIQUES DE KRISTENSEN (BIOTYPES).

Kristensen, 1926, 1938, a montré que les bacilles typhiques se répartissent en trois types, d'après leurs caractères fermentatifs : Certaines cultures, les plus nombreuses (biotype I), font fermenter le xylose, mais non l'arabinose. D'autres (biotype II,) sont sans action sur les deux sucres. Enfin, un très petit nombre (biotype III) les attaquent tous les deux.

De Blasi et Buogo, 1952, admettent l'existence d'un biotype IV, encore plus rare, qui est doué du pouvoir fermentaire vis-à-vis de l'arabinose seul.

D'après Kristensen, 1938, les trois premiers types fermentatifs sont stables. Ils présenteraient par conséquent un grand intérêt en épidémiologie.

Cette opinion, généralement admise, est contredite toutefois par quelques auteurs, parmi lesquels Attimonelli, 1947, Reul, 1949, et de Blasi et Buogo, 1952.

Même si l'on admet que les types de Kristensen sont constants, la trop grande inégalité de leur distribution ne permet de tirer parti qu'assez exceptionnellement des renseignements donnés par cette épreuve : sur 2 118 cultures de *S. typhi*, Kristensen a trouvé mille six cent soixante-huit fois le type I (77,7 p. 100), quatre

cent quarante-neuf fois le type II (21,1 p. 100) et une seule fois le type III (0,046 p. 100).

Jude et Nicolle, 1949, ont établi, pour 280 cultures originaires de France, d'Afrique du Nord, d'A.O.F., d'Indochine et de Nouvelle Calédonie, la distribution suivante : type I : 234 (83,5 p. 100) ; type II : 35 (12,5 p. 100) ; type III : 11 (4 p. 100).

Buczowski et Lachowicz, 1950, ont examiné 1 007 cultures de *S. typhi* isolées en Pologne (région de Gdansk et Gdynia) : ils ont rencontré le type I dans 72,4 p. 100 ; le type II dans 21,9 p. 100 ; le type III dans 0,89 p. 100 et des cultures de réaction atypique ou douteuse dans 0,69 p. 100 des cas.

De Blasi et Buogo, 1952, sur 312 cultures de *S. typhi* isolées en Italie centrale, de mars 1950 à mai 1951, ont obtenu deux cent quinze fois le type I (69 p. 100) ; soixante fois le type II (19,2 p. 100) ; trente-quatre fois le type III (10,8 p. 100) et trois fois le type IV (0,9 p. 100).

RÉSULTATS DE NOTRE EXPÉRIMENTATION.

a) RÉPARTITION GLOBALE DES TYPES BIOCHIMIQUES DE *S. TYPHI*. — A notre tour, nous avons examiné le pouvoir fermentatif sur le xylose et l'arabinose de 1 069 cultures de *S. typhi*, isolées entre 1951 et 1953 dans différents pays d'Europe (Allemagne, Autriche, France, Grèce, Turquie), d'Afrique du Nord (Algérie, Tunisie, Maroc), d'Afrique noire (A.O.F., Cameroun, Congo Belge, Madagascar), d'Asie (Iran, Indochine), d'Amérique (Martinique, Guadeloupe, Venezuela).

Nos résultats globaux, pour toutes ces cultures de provenances très diverses, ont été les suivants : 767 cultures appartenaient au type I (71,7 p. 100), 290 au type II (27,1 p. 100), 9 au type III (0,84 p. 100) et 3 au type IV (0,28 p. 100).

Dans l'ensemble, nous pouvons confirmer la grande inégalité de distribution des trois premiers types biochimiques de *S. typhi* signalée par tous les auteurs : le type I prédomine très largement ; le type II est beaucoup moins fréquent ; le type III est exceptionnel.

Nos résultats diffèrent cependant quelque peu de ceux qui ont été publiés antérieurement : ainsi notre pourcentage des cultures du type II est sensiblement plus élevé. Cela tient sans doute à ce que notre matériel bactériologique comprenait une proportion assez importante de cultures appartenant au lysotype M (Indochine), qui, nous le verrons plus loin, sont exclusivement du type II, alors que ce lysotype M n'était pas représenté dans les lots de cultures de nos prédécesseurs.

Notre pourcentage du type III est voisin de celui des auteurs polonais. Il est beaucoup plus faible que celui des Italiens.

Enfin, nous confirmons l'existence d'un type IV, signalé pour

la première fois, semble-t-il, par de Blasi et Buogo 1952. Toutefois la proportion que nous avons obtenue avec nos cultures est sensiblement plus faible que celle qui est indiquée par ces derniers.

b) DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DES TYPES BIOCHIMIQUES DE *S. TYPHI*. — On trouvera dans le tableau I la répartition des 4 types biochimiques de *S. typhi* dans les différents pays d'origine de nos cultures.

TABLEAU I. — Distribution géographique des types biochimiques de *Salmonella typhi*.

Pays	Nombre de cultures	Types biochimiques			
		I	II	III	IV
Allemagne	79	63	16	-	-
Autriche	224	173	48	2	I
France	93	70	21	I	I
Grèce (Athènes)	26	17	9	-	-
Turquie (Stamboul)	8	5	3	-	-
Algérie	28	24	4	-	-
Tunisie	107	56	45	5	I
Maroc	4	-	4	-	-
A.O.F.	13	9	4	-	-
Cameroun	30	12	18	-	-
Congo Belge	80	61	19	-	-
Madagascar	15	7	7	I	-
Iran	42	32	10	-	-
Indochine	230	163	67	-	-
Martinique	5	5	-	-	-
Guadeloupe	7	6	I	-	-
Vénézuëla	18	18	-	-	-
	1009	721	276	9	3

Ce tableau nous montre qu'on a pu identifier : les 4 types dans les lots de cultures provenant d'Autriche (224), de France (93) et de Tunisie (107) ; 3 types (I, II et III) parmi les cultures isolées à Madagascar (15) ; 2 types (I et II) parmi les 543 cultures originaires d'Allemagne (79), de Grèce (26), de Turquie (8), d'Algérie (28), d'A.O.F. (13), du Cameroun (30), du Congo Belge (80), d'Iran (42), d'Indochine (230), de la Guadeloupe (7) ; et un seul type, soit le type I dans les cultures reçues du Venezuela (18) et de la Martinique (5), soit le type II pour les 4 cultures du Maroc.

Le nombre des cultures reçues est trop faible, dans beaucoup

de cas, pour autoriser à tirer des conclusions valables sur la distribution des types suivant les régions.

Cependant, on ne manquera pas de remarquer que ce n'est pas toujours pour les pays le mieux représentés que nous avons trouvé le plus grand nombre de types : ainsi les 230 cultures d'Indochine n'appartiennent qu'à 2 types (types I et II), tandis que les 15 cultures de Madagascar se répartissent en 3 types.

Il y a là, croyons-nous, une indication intéressante sur la diversité de la distribution des types biochimiques de *S. typhi* dans les différents pays et un encouragement à continuer l'étude de cette question.

STABILITÉ ET CONSTANCE DES TYPES BIOCHIMIQUES.

Dans tous les cas, sans aucune exception, où la notion de foyer épidémique a pu être établie avec certitude, les bacilles isolés appartenaient, non seulement au même type bactériophagique, mais aussi au même type biochimique.

Voici quelques exemples parmi de nombreux autres (tableau II) :

TABLEAU II. — Quelques exemples de constance des biotypes de *S. typhi* dans des foyers épidémiques (2).

Origine	Expéditeurs	Nombre de cultures	Lysotype	Biotype
Oswestry	Dr. Felix	8	A	I
Welshpool	"	3	A	I
Massa	de Blasi	2	A	I
Asmara	"	4	A	I
S. Merino	"	2	A	I
Chamblee	Dr. Edwards	2	A	I
Lansing	Dr. Ferguson	3	A	I
St. Nezaire	Dr. You	3	A	II
Tunis	Dr. G. Renoux	3	A	II
Katwa	Dr. Van Oye	4	A	II
Butembo	"	2	A	II
Salford	Dr. Felix	7	E ₁	I
Chamblee	Dr. Edwards	4	E ₁	I
Bruxelles	Dr. Beumer	4	E ₁	I
Wuppertal	Dr. Preuss	4	E ₁	I
Lansing	Dr. Ferguson	2	F ₁	I
Wuppertal	Dr. Preuss	3	F ₁	I
Richmond	Dr. Felix	4	N	II
Cap Bon	Dr. G. Renoux	11	O	II
Truro	Dr. Felix	9	T	II
Nice	Dr. Robini	7	I+IV	I

(2) Nous adressons à nos collègues français et étrangers nos sincères remerciements pour leurs envois de cultures de *S. typhi* et pour les renseignements épidémiologiques concernant ces cultures.

D'autre part, comme nous le verrons plus loin, les cultures de certains types bactériophagiques se sont montrées homogènes ou presque homogènes dans leur pouvoir fermentatif : lysotype M : 50 cultures du type II ; lysotype D₂ : 10 cultures du type I ; lysotype G : 14 cultures du type I ; lysotype C : 43 cultures du type I et 1 culture seulement du type II.

Ces résultats sont donc en parfait accord avec l'opinion exprimée par Kristensen, Olitzki, Jude et Nicolle, et Felix et Anderson, 1952, sur la constance, donc sur la valeur épidémiologique des types fermentatifs de *S. typhi*. Nous ne nous sommes jamais trouvés en présence d'un cas semblable à celui relaté par de Blasi (dont il sera question plus loin).

A plusieurs reprises, il est vrai, nous avons observé des virages dans les tubes de xylose et d'arabinose (type III) pour des cultures qui, d'après les renseignements épidémiologiques n'auraient pas dû attaquer ce dernier sucre (type I). Dans tous ces cas, nous avons pu constater que les cultures étaient contaminées par un autre germe. Après purification, elles ont donné les réactions du type I.

En présence de ces résultats, il nous semble que la détermination des types biochimiques de *S. typhi* présente, même utilisée seule, un intérêt évident en épidémiologie, sauf dans quelques cas particuliers (certains lysotypes homogènes dans leurs caractères fermentatifs, certains pays à prépondérance presque exclusive du type I).

Cet intérêt ne peut évidemment qu'augmenter lorsqu'on emploie la méthode biochimique en combinaison avec la lysotypie.

MÉTHODE BIOCHIMIQUE CONJUGUÉE AVEC LA LYSOTYPIC.

Olitzki et coll., 1948, 1949, semblent avoir été les premiers à mettre en pratique cette combinaison. Ils ont modifié du reste la méthode de Kristensen par l'adjonction du glycérol, du sorbitol, du citrate et du *D*.tartrate, ce qui leur a permis de distinguer non plus 3, mais 6 types fermentatifs.

Jude et Nicolle, 1949, ont également utilisé la méthode de Kristensen en conjugaison avec la lysotypie. Leurs résultats ont été satisfaisants.

De Blasi et Buogo, 1952, ont observé la coexistence des 4 types fermentatifs parmi les 24 cultures du type E₁ isolées dans un foyer (épidémie de Peccioli). Ils en ont conclu que la méthode n'avait qu'une faible valeur épidémiologique.

Felix et Anderson, 1951, ont préconisé l'utilisation de la méthode biochimique pour compléter la lysotypie dans les cas de foyers à lysotypes communs.

DISTRIBUTION DES TYPES BIOCHIMIQUES PARMI LES LYSOTYPES.

Lysotype A. — Sur 1 069 cultures de *S. typhi* originaires des pays énumérés plus haut, nous en avons trouvé 220 qui appartenaient au type bactériophagique A. Parmi ces 220 cultures du type A, 128 avaient les caractères biochimiques du type I de Kristensen (58,1 p. 100), 89 ceux du type II (40,4 p. 100), 1 ceux du type III (0,45 p. 100) et 2 ceux du type IV (0,9 p. 100) [voir la figure 1 au paragraphe « Discussion »].

Le lysotype A est donc hétérogène dans ses propriétés fermentatives. Il apparaît donc, étant donné d'une part la fréquence du type A dans beaucoup de pays, en particulier en Angleterre et en Afrique, et d'autre part la répartition relativement satisfaisante des biotypes parmi les cultures de ce lysotype, qu'il y a tout bénéfice à compléter la lysotypie de ce type par l'épreuve biochimique.

Lysotype C. — Sur les 44 cultures du lysotype C, 43 appartenaient au biotype I (97,7 p. 100) et 1 seule au biotype II (2,2 p. 100).

Jude et Nicolle, 1949, avaient noté une semblable quasi uniformité fermentaire pour ce lysotype (16 cultures du type I pour 1 seule du type II).

Si cette particularité du lysotype C se confirme par la suite (remarquons qu'aucun autre auteur ne l'a mentionnée), il est évident que la méthode biochimique ne pourra ajouter aucun renseignement complémentaire à la lysotypie dans ce cas.

Lysotype D₁. — Sur 54 cultures de ce type, 53 appartenaient au biotype I (98 p. 100) et 1 seule au biotype III (1,8 p. 100). Notons pour ce lysotype la quasi uniformité fermentaire et l'absence du type II.

Lysotypes D₂, D₄ et D₅. — Les 10 cultures du lysotype D₂, les 6 cultures du lysotype D₄, les 2 cultures du lysotype D₅ appartenaient au biotype I.

Lysotype D₆. — Sur 8 cultures de ce type, 6 étaient du type I, 2 du type II.

Lysotype E₁. — 254 cultures du lysotype E₁ venant d'une douzaine de pays ont été étudiées. 240 étaient du type I (94,4 p. 100), 9 du type II (3,5 p. 100) et 5 du type III (1,9 p. 100).

Cette prépondérance du biotype I parmi les cultures du lysotype E₁ avait été notée par Jude et Nicolle, 1949, et par Buczowski et Lachowicz, 1950; de Blasi et Buogo, 1952, pour 100 cultures du type E₁, en ont trouvé 70 du biotype I, 8 du biotype II, 20 du biotype III et 2 du biotype IV.

Nos résultats montrent que la méthode biochimique est pratiquement impuissante à subdiviser le lysotype E₁.

Cette constatation est assez regrettable, car ce lysotype est

l'un des plus communs et l'un des plus ubiquitaires et sa subdivision aurait été extrêmement utile.

Lysotype F₁. — Sur 63 cultures de ce type, 62 étaient du type I (98,4 p. 100) et 1 du type II (1,5 p. 100).

Lysotype F₂. — Les 2 cultures étaient du type I.

Lysotype G. — Les 14 cultures étaient du type I.

Lysotype J. — Sur 14 cultures, il y en avait 12 du type I et 2 du type II.

Lysotype L₁. — Sur 5 cultures, 4 étaient du type I et 1 du type II.

Lysotype M. — Les 50 cultures de ce type provenant d'Indochine (Saïgon et Hanoi) appartenaient au seul biotype II (100 p. 100).

Dans ce cas, la méthode biochimique n'a aucune utilité.

Lysotype N. — Sur 24 cultures, le type I a été rencontré 9 fois (37,5 p. 100) et le type II 15 fois (62,5 p. 100).

Il convient de souligner ici le renversement de la prépondérance en faveur du type II (noté également par les auteurs polonais), et en même temps, l'utilité de la méthode biochimique dans le cas du lysotype N.

Lysotype N + D₁ (variété du type N). — Sur 29 cultures, on en a trouvé 15 du type I (51,7 p. 100) et 14 du type II (48,2 p. 100).

Là encore, la méthode biochimique peut rendre de grands services en raison de la répartition presque égale des deux biotypes.

Lysotype O. — 21 cultures du type O se sont trouvées réparties en 5 cultures du biotype I (23,8 p. 100) et 16 cultures du biotype II (76,1 p. 100). Mêmes remarques que pour le type N.

Lysotype T. — Sur 34 cultures, on a identifié 19 fois le type I (55,8 p. 100) et 15 fois le type II (44,1 p. 100). La méthode biochimique doit donner ici encore des résultats intéressants.

Lysotypes 27 et 28. — 1 seule culture du type 27 était du type I ; 5 cultures du type 28 étaient du type II.

Lysotype 29. — Sur 13 cultures, 8 étaient du type I (61,5 p. 100) et 5 du type II (38,4 p. 100).

Groupe I + IV. — Sur 145 cultures de ce groupe (cultures Vi non caractérisables), 102 donnaient les réactions du type I (70,3 p. 100), 42 celles du type II (28,9 p. 100) et 1 seule celles du type III (0,68 p. 100).

Ce groupe, l'un des plus importants à subdiviser, peut donc bénéficier de la méthode biochimique.

Cultures Vi-dégradées. — Sur 42 cultures donnant des réactions hétérologues très fortes avec de nombreux phages (cultures Vi-dégradées, Felix, 1951), 18 étaient du type I (42,8 p. 100),

22 du type II (52,3 p. 100), 1 seule du type III (2,3 p. 100) et 1 seule aussi du type IV (2,3 p. 100).

En conclusion, bien que certains lysotypes semblent présenter des réactions biochimiques très homogènes (types C, E₁, G, M, etc.), beaucoup d'autres sont suffisamment hétérogènes pour bénéficier de la méthode biochimique (types A, D₆, L₁, N, N + D₁, O, T, 29, groupe I + IV, cultures Vi-dégradées).

FRÉQUENCE DES TYPES BIOCHIMIQUES

PARMI LES CULTURES D'UN LYSOTYPE ISOLÉES DANS UN MÊME PAYS.

Parmi les cultures du type A provenant de certains pays, la totalité ou la presque totalité appartenaient au biotype I (Indochine, Venezuela, Algérie, Martinique) ou au type II (Madagascar, A. O. F., Cameroun, Grèce) ou encore elles se répartissaient assez également entre ces deux types (Allemagne, France, Autriche, Congo Belge, Tunisie).

Pour le type D₁, la grande majorité des cultures d'Autriche étaient du type I, alors que 2,5 p. 100 étaient du type II.

Pour le type C, nous l'avons vu, la presque totalité des cultures, quelle que soit leur provenance, étaient du biotype I. Il en a été presque de même pour le type E₁ : les cultures du type E₁ de certains pays semblent n'appartenir qu'au type I (Indochine, Allemagne, Grèce). Pour d'autres pays, on a trouvé cependant une certaine proportion du type II (Guadeloupe, France, Congo Belge) et aussi du type III (Autriche, Tunisie). Le type III, parmi les cultures tunisiennes du lysotype E₁, semble assez fréquent (11,4 p. 100).

Pour le type F₁, dans la plupart des pays, toutes les cultures appartenaient au biotype I, exception faite pour l'Indochine.

Toutes les cultures du type G appartenaient au type I.

Pour le type J, les cultures d'Indochine étaient toutes du type I, celles de Tunisie (2) étaient du type II.

Toutes les cultures du type M d'Indochine sont du type II. Nous n'avons jamais trouvé ce lysotype dans d'autres pays.

Les cultures du type N venant d'Indochine, d'Autriche, de Grèce étaient toutes du type II. Celles que nous avons reçues d'Iran étaient en majorité du type I.

Pour la variété N + D₁ du type N, les cultures d'Indochine étaient toutes du type I, celles d'Allemagne, d'Autriche, de Tunisie étaient toutes du type II. Celles de France étaient en majorité du type II.

Pour le lysotype O, la répartition s'est montrée à peu près égale entre les types I et II pour l'Indochine et l'Autriche. Pour la France, les 2 seules cultures du type O appartenaient au type I, les 11 cultures de Tunisie étaient du type II.

Les cultures du type T étaient toutes du type I en Indochine

et en Turquie. En France et en Tunisie, elles se répartissaient entre le type I et le type II. En Iran, les 2 cultures de ce type étaient du type II.

Les cultures du type 29 étaient soit du type I, soit du type II en Indochine, en Allemagne et en Autriche. Une culture provenant d'Algérie, une autre de Grèce étaient du type II.

Les cultures du groupe I + IV étaient toutes du type I en A. O. F., au Cameroun, au Venezuela, en Grèce et toutes du type II à Madagascar, au Maroc, en Algérie.

Le type I prédominait sur le type II en Indochine, au Congo Belge, en Tunisie et en Iran. Le type I prédominait sur le type III en France. Le type II prédominait sur le type I en Allemagne et en Turquie. Les deux types I et II s'équilibraient approximativement en Autriche.

Enfin, pour le groupe des cultures Vi-dégradées, le type I existait seul parmi les cultures venant du Cameroun, tandis qu'il prédominait sur le type II en Indochine et en Grèce. Le type II prédominait sur le type I en France. Les cultures isolées en Tunisie se répartissaient entre les types I, II et III avec prédominance du type II. Celles d'Autriche, entre les types I, II et IV avec prédominance du type II.

DISCUSSION.

La lysotypie du bacille typhique présente avant tout, on le sait, un intérêt épidémiologique. Grâce à elle, il est possible, en de nombreuses circonstances, d'affirmer la filiation contagieuse entre des malades voisins hébergeant des bacilles du même type ou, au contraire, d'exclure toute communauté de contamination entre eux si leurs bacilles sont de types différents.

Il arrive malheureusement souvent que les lysotypes de *S. typhi* soient très peu nombreux dans une région — c'est ce qui se produit par exemple en Afrique noire où on n'observe guère que 2 ou 3 types —, ou bien que l'un des types prédomine fortement sur tous les autres : c'est le cas pour l'Angleterre où le type A est très commun et pour la France où, en 1949-1950, plus de 40 p. 100 des cultures reçues appartenaient au type C.

Dans de tels cas, les résultats de la lysotypie risquent d'être sans utilité épidémiologique.

Cependant, pour tenter d'accroître l'efficacité de la méthode, divers auteurs (Olitzki, Jude et Nicolle, Buczowski et Lachowicz, de Blasi et Buogo, Felix et Anderson) ont suggéré de leur adjoindre une épreuve biochimique : la recherche de propriétés fermentatives des cultures à l'égard du xylose et de l'arabinose. Kristensen avait décrit 3 types, de Blasi et Buogo en ont signalé un quatrième.

A notre tour, nous avons appliqué la détermination des biotypes de *S. typhi* en conjugaison avec la lysotypie sur plus de 1 000 cultures provenant de nombreux pays.

Nos résultats nous permettent d'apporter les précisions suivantes :

Nous pouvons confirmer l'existence du biotype IV (xylose négatif, arabinose positif).

Nous avons obtenu une distribution globale des biotypes assez semblable à celle qui a été donnée par nos prédécesseurs.

A peu près les 3/4 des cultures appartiennent au type I, 1/4 au type II ; le type III est très rare ; le type IV est exceptionnel.

Dans tous les cas, très nombreux, où nous avons eu entre les mains des cultures provenant avec certitude d'un même foyer, ces cultures montraient les mêmes caractères fermentatifs : les biotypes de *S. typhi* sont donc stables et constants. Ils ont, comme les lysotypes, une valeur épidémiologique.

La distribution des biotypes de *S. typhi* varie suivant les pays : nous les avons trouvés tous les quatre parmi des cultures provenant d'Autriche, de France et de Tunisie ; nous avons observé les trois premiers à Madagascar ; le biotype I et le biotype II dans la plupart des autres pays ; enfin le type I seul à La Martinique et au Venezuela.

Du fait de l'extrême rareté des biotypes III et IV, on ne peut espérer dans les cas favorables, obtenir mieux qu'un partage binaire des lysotypes.

Au surplus, dans la mesure où nous avons le droit d'interpréter les résultats d'observations faites sur un nombre relativement limité de cultures pour chaque lysotype, et très inégal de l'un à l'autre, nous voyons que la division semble ne pouvoir s'effectuer que pour certains d'entre eux et que, lorsqu'elle est possible, elle se fait en fractions d'importance inégale.

En effet, un simple coup d'œil sur la figure 1 nous indique que certains lysotypes se sont montrés homogènes dans leurs propriétés fermentatives et que d'autres, au contraire, se sont montrés hétérogènes. Parmi ces derniers, quelques-uns présentent une telle prédominance d'un biotype sur l'autre qu'on doit les considérer comme faisant partie du groupe homogène. Tout ce groupe, homogène ou presque homogène, semble donc réfractaire à la subdivision biochimique. Ce sont les lysotypes C, D₁, D₂, D₄, D₅, E₁, F₁, F₂, G (composés exclusivement ou en forte majorité de cultures du biotype I) et les lysotypes M et 28 (formés de cultures du biotype II).

Le groupe hétérogène comprend les lysotypes A, D₆, J, L₁, N, N + D₁, O, T, 29, le groupe I + IV et les cultures Vi-dégradées. Ces lysotypes bénéficieront, à des degrés variés, de la subdivision biochimique.

En dehors des conséquences pratiques de ces constatations pour l'épidémiologie, on ne peut manquer d'être frappé du fait que, le type A mis à part, la plupart des types rangés à gauche, de C à G inclus, sont en totalité ou en grande majorité composés de cultures appartenant au biotype I et que pour les lysotypes de droite, à partir de J jusqu'aux cultures Vi-dégradées, la prédominance du biotype II devient presque la règle. Parfois même, certains lysotypes (M, 28) n'ont pas présenté une seule culture du type I.

Nous ne sommes pas en mesure actuellement de fournir une explication de ce phénomène. Cependant, on peut déjà se

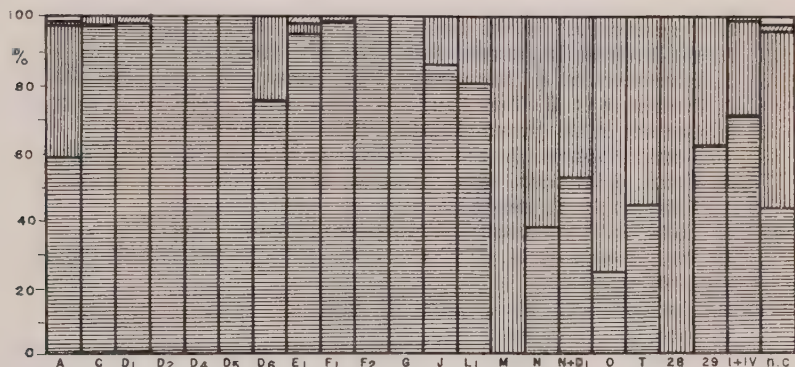


FIG. 4. — Traits horizontaux : type I. Traits verticaux : type II.
Traits obliques : type III. Blanc : Type IV.

demander s'il n'y a pas une relation entre la place que les lysotypes occupent dans l'échelle de Craigie et Felix et la prédominance fermentative de leurs cultures.

CONCLUSION.

Les résultats de nos observations sur les propriétés fermentatives de *S. typhi* montrent que certains lysotypes peuvent être subdivisés par la méthode biochimique et que d'autres sont réfractaires à la subdivision. Combinée à la lysotypie, la méthode biochimique sera donc utile, mais elle ne pourra apporter qu'une aide limitée.

Les lysotypes, placés dans l'ordre alphabétique qui leur a été assigné par Craigie et Felix, se séparent en deux groupes distincts : le groupe de gauche montre une nette prédominance du biotype I ; le groupe de droite présente une proportion beau-

coup plus importante et quelquefois même une prédominance du biotype II.

Ce phénomène, s'il se trouve confirmé par nos observations ultérieures, traduirait l'existence d'une relation très intéressante entre les différences dans les capacités fermentatives des germes et les différences dans la sensibilité aux bactériophages.

Ce travail a été effectué avec l'assistance technique de M^{me} G. Diverneau, M^{lle} J. Rembert et M. G. Brault.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. ATTIMONELLI. *Giorn. Batt. Immunol.*, 1947, **31**, 197.
- [2] R. DE BLASI et H. BUOGO. *Riv. Ital. Ig.*, 1952, **12**, 15.
- [3] J. BUCZOWSKI et K. LACHOWICZ. *Med. Dosw. Mikrob.*, 1950, **2**, 262.
- [4] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Canad. J. publ. Hlth.*, 1938, **29**, 448 et 484.
- [5] J. CRAIGIE et A. FELIX. *Lancet*, 1947, **1**, 823.
- [6] A. FELIX. *Rapport pour le Congrès de Rio de Janeiro*, 1950.
- [7] A. FELIX. *Brit. med. Bull.*, 1951, **7**, 153.
- [8] A. FELIX et E. S. ANDERSON. *J. Hyg.*, 1951, **49**, 349.
- [9] A. Jude et P. NICOLLE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 550.
- [10] M. KRISTENSEN et H. C. HENRIKSEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1926, **2**, 289.
- [11] M. KRISTENSEN. *J. Hyg.*, 1938, **38**, 688.
- [12] P. NICOLLE et A. JUDE. *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 31.
- [13] P. NICOLLE, Y. HAMON et E. EDLINGER. *Biol. Méd.*, 1953, **42**, 437-512.
- [14] P. NICOLLE, M. PAVLATOU et G. DIVERNEAU. *C. R. Ac. Sci.*, 1953, **236**, 2453.
- [15] A. L. OLITZKI, M. SHELUBSKY et W. STRAUSS. *Harefuch*, Tel Aviv, 1948, 107.
- [16] L. OLITZKY et M. SHELUBSKY. *The Research Council of Israel*, Jérusalem, 1949.
- [17] E. VAN OYE et P. NICOLLE. *Bull. Soc. path. exot.*, 1953, **46**, 48.
- [18] R. REUL. *Ann. Soc. Belge Méd., trop.*, 1949, **29**, 329.

RAPPORTS ENTRE LA STRUCTURE DES ACRIDINES ET LEUR ACTIVITÉ EN TANT QU'AGENTS INDUCTEURS DE MUTANTS RESPIRATOIRES CHEZ LA LEVURE (*)

par H. MARCOVICH.

*[Laboratoire de Génétique, de la Faculté des Sciences
et du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (**).]*

INTRODUCTION.

L'étude comparée d'une série de substances apparentées constitue un des moyens de déterminer la propriété responsable d'une activité biologique définie. Ainsi, par exemple, on a pu montrer que l'action bactériostatique des acridines varie dans la série de ces substances de la même manière que la concentration ionique, ce qui explique l'influence prépondérante du pH du milieu, en relation avec le pKa et permet de conclure que c'est le cation d'acridine qui est la forme active [4].

Dans le présent travail, effectué sur la levure, nous nous sommes proposé de rechercher si l'on pouvait rattacher un effet mutagène particulier (voir ci-dessous) et l'effet toxique des acridines à des propriétés bien définies de ces substances.

★ ★

La plupart des souches de levure contiennent des mutants spontanés, caractérisés par des colonies plus petites que celles du type normal, d'où les noms de « grandes » et de « petites » donnés respectivement aux colonies normales et mutantes, ainsi qu'aux cellules dont elles sont issues [2]. La taille réduite des colonies formées par les mutants est la manifestation d'une déficience respiratoire liée à l'absence de la cytochrome oxydase [3]. Au point de vue génétique, la mutation en question serait le

(*) Travail aidé par une subvention du Damon Runyon Memorial Fund for Cancer Research au Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences.

(**) Adresse actuelle : Institut du Radium, Paris.

résultat de la perte (ou de l'altération irréversible) d'un facteur cytoplasmique particulière et autoreproductible [4, 5].

Ephrussi, Hottinguer et Chimenes [2] ont montré que l'acri-flavine possède la propriété d'augmenter considérablement la fréquence des mutants dans une population de levures en voie de multiplication. Des deux hypothèses envisagées pour expliquer cette augmentation, sélection ou induction de mutation, la seconde s'est trouvée confirmée de deux manières indépendantes. La première méthode, indirecte, est l'étude de l'évolution de la population de levures en fonction du temps de croissance en présence d'acri-flavine. Elle a montré que l'accroissement du nombre de mutants dépend essentiellement de la proportion des « grandes » [5]. La deuxième, directe, consiste à isoler des cellules individuelles dans des gouttelettes de milieu additionné de la substance mutagène à la concentration voulue, à en isoler les bourgeons successifs et à les transporter, ainsi qu'en fin d'expérience la cellule-mère elle-même, dans un milieu dépourvu d'acri-flavine. Il a été montré de cette façon que la fréquence de clones mutants issus des cellules filles formées en présence d'acri-flavine est beaucoup plus élevée que chez les témoins. On a constaté, d'autre part, que la cellule-mère reste « grande » pendant quelques divisions, puis peut muter : la fréquence de mutation des cellules-mères est d'autant plus élevée qu'elles ont produit plus de bourgeons dans le milieu mutagène [6].

L'acri-flavine est un mélange de deux diamino acridines : l'euflavine (2-8 diamino N méthyl acridine) et la proflavine (2-8 diamino acridine), dans les proportions approximatives de 2 : 1, et doit son activité à la première [7]. Une étude détaillée de l'action de l'euflavine en milieu synthétique a permis de conclure que l'activité mutagène et la toxicité sont deux propriétés différentes de cette substance, que les « grandes » et les « petites » présentent des sensibilités très voisines à son action toxique et que, dans les concentrations où l'activité mutagène est maxima, pratiquement toute la descendance des cellules normales est mutante [7].

C'est en recherchant comment se distribuent la toxicité et l'activité mutagène au sein d'une série d'acridines et parmi quelques autres substances que nous avons cherché à élucider les « raisons moléculaires » de ces deux propriétés.

PRINCIPE DES EXPÉRIENCES.

1° Au cours du travail déjà cité sur l'euflavine [7], nous avons proposé une mesure de l'activité mutagène fondée sur le fait que cette activité ne porte pratiquement que, sur la *descendance* des

« grandes ». Cette mesure est donnée par la probabilité π avec laquelle l'une quelconque des cellules prises dans cette descendance est mutante, soit :

$$\pi = \frac{n_p}{n_g + n_p}$$

où n_p et n_g sont respectivement les nombres de « petites » et de « grandes » parmi $n_p + n_g$ cellules filles. π est en fait le taux de mutation de la descendance. Sa valeur n'est pas directement accessible, la seule grandeur fournie par l'expérience étant le pourcentage de « petites » au cours des étapes successives de la croissance de la culture.

On peut montrer (1) que le niveau de l'équilibre qui s'établit dans une population mixte de « grandes » et de « petites » en croissance exponentielle est donné par la relation :

$$f_p = \frac{\pi}{2 - 2^\lambda}$$

où f_p est la fréquence des petites, π le taux de mutation et λ le taux de sélection défini par le rapport : taux de croissance des « petites » / taux de croissance des « grandes ».

Toutes les conditions qui feront varier π ou λ , modifieront f_p . D'autre part, toute variation de la fréquence des mutants est l'indice d'une modification, soit du taux de sélection, soit du taux de mutation.

On peut théoriquement concevoir des variations de π et de λ qui se compenseraient, de sorte que f_p ne serait pas modifié. L'activité mutagène pourrait dans ce cas être masquée. Nous verrons qu'une telle éventualité est très improbable.

2° Ainsi que l'ont montré Ephrussi, Hottinguer et Chimènes [2], l'activité mutagène de l'acriflavine ne se manifeste pas sur des cellules dont la croissance est arrêtée. Afin de permettre la distinction, dans les mêmes conditions, entre facteurs responsables respectivement de la mutagenèse et de la toxicité, le critère de l'action toxique doit donc s'appliquer à des cellules proliférantes. En conséquence nous dirons d'une concentration d'une substance donnée qu'elle est toxique si elle ralentit la multiplication de la levure pendant la période de croissance logarithmique. La toxicité de la substance en question sera alors déterminée, dans une échelle de concentrations donnée, par la manière dont varie ce pouvoir inhibiteur.

3° Les expériences consisteront donc à suivre la croissance des cultures de levure dans des concentrations variées des substances

(1) Voir Appendice.

étudiées et à mesurer les variations de la proportion de « petites » dans les populations.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

La levure utilisée est la souche « Boulangerie II » de *Saccharomyces cerevisiae* provenant de la collection du Laboratoire des Fermentations de l'Institut Pasteur de Paris.

Le milieu est le même que celui utilisé dans un travail antérieur [7]. Rappelons que c'est un milieu synthétique dont le pH est 6,2. Il est suffisamment tamponné pour que son pH reste constant pendant toute la durée des expériences.

Les cultures sont effectuées à 25°, dans l'obscurité.

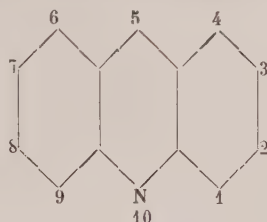
Le pourcentage des « petites » est déterminé par étalements sur milieu gélosé en boîtes de Petri.

La croissance totale de la culture est déterminée soit photométriquement, soit par comptage de colonies.

Les expériences dont il sera question sont de deux types. Les unes, dites « expériences de concentration », consistent à cultiver les levures pendant vingt-quatre heures à différentes concentrations de la substance étudiée dans un volume de 5 cm³ de milieu en tube à essai et à déterminer la croissance globale de la culture (par photométrie) et le pourcentage des petites. Les autres, dites « expériences en fonction du temps », sont du type décrit par Ephrussi et ses collaborateurs [5, 7] : on y suit, pour une concentration donnée de la substance étudiée, l'évolution en fonction du temps des effectifs des « grandes » et des « petites » ; la croissance de la culture est, ici, mesurée par numération de colonies. Dans un cas comme dans l'autre l'inoculum est tel qu'au temps 0, il y a 10⁴ cellules au centimètre cube ; en vingt-quatre heures, la culture est encore en période exponentielle.

Le critère de la taille, qui sert à distinguer les colonies mutantes des colonies normales, est à lui seul insuffisant, car il est évident que toute déficience métabolique compatible avec une croissance limitée tendra, elle aussi, à réduire les dimensions des colonies. Un autre caractère peut servir à les distinguer : l'absence chez les mutants des cytochromes *a* et *b*. Pour chaque substance ayant provoqué une augmentation du pourcentage des petites colonies, la nature de ces dernières sera donc contrôlée par l'examen spectroscopique. Ce contrôle est fait de la manière suivante : on prélève chaque colonie à tester, on la disperse dans 1 goutte de milieu déposé dans une boîte Petri contenant du Yeast Extract gélosé, puis on étale la goutte à la surface de la gélose. Au bout de trois à quatre jours de croissance, on prélève l'ensemble de la culture ainsi développée et on l'examine au spectroscope de Hartridge.

La notation du noyau d'acridine que nous adoptons est celle utilisée par Albert [9] :



Le tableau I donne la liste des acridines utilisées (2) et indique leurs principales caractéristiques. L'index bactériostatique, calculé d'après la concentration minima suffisante pour arrêter la croissance de bactéries variées, est tiré du travail d'Albert et de ses collaborateurs [4].

TABLEAU I.

	INDEX bactériostatique	pKa	IONISATION à pH = 6,2 p. 100
Acridine	6	5,3	11
2-amino-acridine	21	7,7	97
3 amino-acridine	8	5,6	20
5 amino-acridine	25	9,6	100
2-8 diamino acridine (Proflavine)	22	9	100
2-7 diamino acridine	26	7,8	98
2-8 diamino-4-9 diméthyl acridine (acridine orange)	17	10,1	100
<i>Acridines quaternaires :</i>			
N méthyl-acridine	?	?	?
2 amino N méthyl-acridine . . .	19	11,8	100
5 amino N méthyl-acridine . . .	23	10,7	100
2-8 diamino N méthyl-acridine (euflavine)	22	12	100

La N méthyl acridine mise à part, toutes les autres substances sont très stables dans les conditions où nous nous sommes placé. Les acridines étant généralement sensibles à la lumière, nos cultures ont été faites à l'obscurité.

Quelques expériences décrites dans le présent travail portent sur des substances autres que les acridines. Ce sont, dans la série du triphényl-méthane, la rosaniline, la pararosaniline, la pentaméthylpararosaniline, l'hexaméthylpararosaniline, et la

(2) Toutes ces substances nous ont été aimablement données par le professeur A. Albert (Australian National University, London).

fuchsine acide. Enfin d'autres corps ont été testés, tels que le bleu de méthylène et la protamine.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. ETUDE DE L'ACTIVITÉ TOXIQUE. — Les « expériences de concentration » (v. p. 202) mettent en évidence une zone de concentrations dans laquelle la croissance de la culture est d'autant plus entravée que la concentration est plus forte. C'est

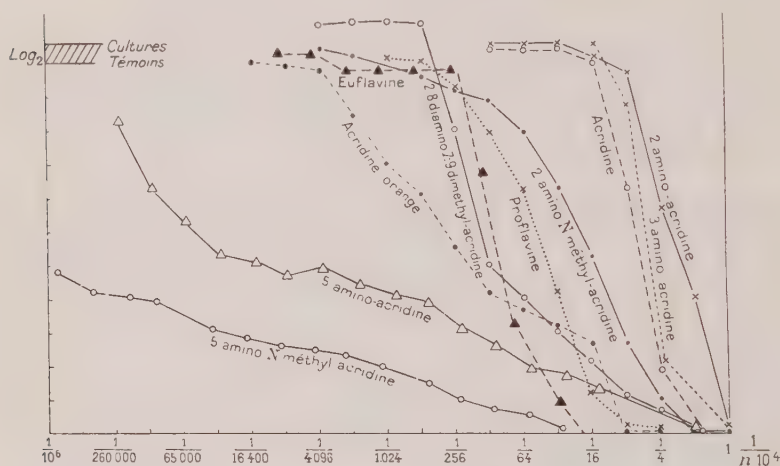


FIG. 1. — Croissance de vingt-quatre heures de la levure de BII, à des concentrations variées de différentes acridines. Abscisses : concentrations pondérales des substances. Ordonnées : log de base 2 de la densité des cultures au bout de vingt-quatre heures de croissance.

la « zone de toxicité variable » dont l'extension et les limites caractérisent chaque substance. La figure 1 donne les courbes obtenues au cours d'expériences avec 10 acridines. On y voit que la zone de toxicité variable est limitée, d'un côté, par les concentrations dépourvues de toxicité et, de l'autre, par les concentrations bactériostatiques, c'est-à-dire celles où il n'y a eu aucune croissance. Dans cette zone, la situation de chaque point des courbes peut être la résultante d'un effet sur la période de latence et d'un effet sur la vitesse de multiplication en période exponentielle. Nous avons cependant vérifié qu'une nette diminution, par rapport au témoin, de la densité de la culture de vingt-quatre heures est toujours liée à une diminution de la vitesse de multiplication.

Les courbes de la figure 1 se groupent en trois familles, corres-

pondant chacune à des corps de toxicité différente. La famille la plus toxique comprend deux acridines aminées sur le carbone 5. Celle de toxicité intermédiaire contient les diaminoacridines. Enfin la moins toxique comprend l'acridine et deux monoaminoacridines, isomères des corps de la première famille. Dans une famille donnée, une substance quaternaire, c'est-à-dire portant un radical sur l'azote du noyau d'acridine, est plus toxique que son homologue tertiaire.

Dans la série du triphénylméthane, seule la fuchsine acide est dépourvue de toxicité. Les quatre dérivés basiques ont une toxicité intermédiaire entre celles de la proflavine et de l'euflavine : la pararosaniline et la rosaniline sont les moins toxiques, puis viennent, par ordre de toxicité croissante, la pentaméthylpararosaniline et l'hexaméthylpararosaniline.

On voit que, chez les acridines, le facteur stérique joue un rôle de premier plan dans le déterminisme du pouvoir toxique tel qu'il est défini ici. Les triphénylméthanes étudiés paraissent d'autant plus toxiques que la méthylation des radicaux aminés est plus importante.

II. ETUDE DE LA MUTAGENÈSE. — 1° Parmi les acridines testées, trois sont capables de produire dans les cultures une augmentation du pourcentage de mutants. Ce sont l'euflavine, la 2-amino-N-méthyl acridine et la proflavine. Les deux premiers sont quaternaires.

Parmi les 5 substances étudiées dans la série du triphénylméthane, seules les 4 bases induisent l'accroissement de la proportion de mutants. La fuchsine acide est totalement inactive. Il en est de même du bleu de méthylène et de la protamine.

2° Connaissant la variation du pourcentage de mutants et le degré de croissance de la culture au bout de vingt-quatre heures, on peut construire les courbes de croissance des « grandes » et des « petites » en fonction de la concentration. La figure 2 donne les résultats d'expériences « de concentration » avec l'euflavine, la 2-amino-N-méthyl acridine, la proflavine et la rosaniline. La courbe des « grandes » épouse aux basses concentrations de ces substances celle de la population totale, puis aux concentrations plus élevées descend plus ou moins rapidement vers un plateau dont le niveau est le même que celui du point correspondant à l'effectif des cellules inoculées et qui contenait une très faible proportion de « petites ». La courbe des « petites » évolue inversement : pour les faibles concentrations, elle est très au-dessous de celle de la population totale, puis, dans la zone des concentrations où les « grandes » baissent, elle s'élève, passe par un maximum qui correspond au début du plateau des « grandes », et enfin décroît. Avec la proflavine, la proportion des « petites »

subit une légère augmentation, mais ne présente pas de maximum.

Dans les cas où le pourcentage des petites s'élève considérablement et où, de ce fait, la croissance de la culture est presque uniquement due à cette augmentation, on peut montrer que la substance étudiée agit en induisant la mutation et non en sélectionnant les mutants spontanés. En effet, la croissance est dans ce cas presque aussi importante que celle de la culture témoin.

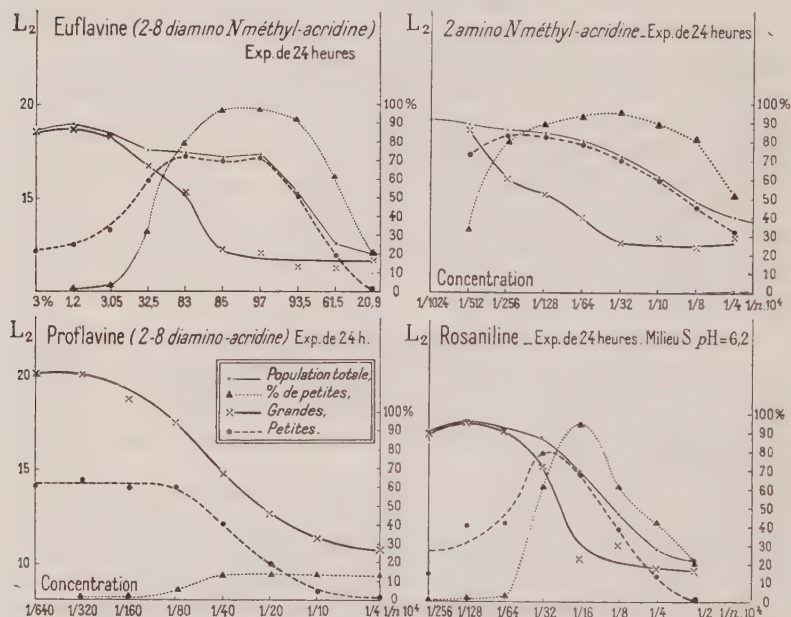


FIG. 2. — Croissance de vingt-quatre heures de la levure BII, à des concentrations variées de quatre substances mutagènes. Abscisses : concentrations pondérales. Ordonnées : log de base 2 de l'effectif des grandes, des petites et de la population totale.

Puisque celle-ci effectuée au cours de l'expérience 7 divisions en moyenne, et puisque le pourcentage de « petites » est au départ inférieur à 1 p. 100, il faudrait admettre, pour attribuer l'effet observé à la sélection, qu'en plus des 7 divisions nécessaires pour atteindre le niveau de la culture témoin, l'effectif des « petites » s'est accru d'une centaine de fois c'est-à-dire que les cellules ayant une déficience respiratoire ont, dans les mêmes conditions d'aérobiose que les « grandes », effectué 6 à 7 divisions de plus. Une telle hypothèse ne nous paraît guère vraisemblable.

La preuve directe de l'induction de mutations par l'euflavine,

fournie par les expériences de microdissection d'Ephrussi et Hottinguer [6], et l'analogie étroite qui existe entre les courbes obtenues en présence de cette substance, de la 2-amino-N-méthyl acridine et de la rosaniline (fig. 2) viennent appuyer notre argument.

On est ainsi conduit à admettre que, dans les concentrations où l'effectif des « grandes » reste stationnaire, les « grandes » ensemencées au départ ne produisent que des cellules mutantes, tout en restant elles-mêmes inchangées. Le taux de mutation π défini plus haut est donc voisin de l'unité. On voit que, dans cette zone de concentrations, la proportion des « petites » décroît quand la toxicité augmente, c'est-à-dire quand la croissance de la culture est entravée. Ce fait est en accord avec la conclusion d'Ephrussi, Hottinguer et Chimenes [2] que l'activité mutagène ne se manifeste qu'à l'occasion du bourgeonnement.

Dans la zone des concentrations où l'effectif des « grandes » augmente et où il y a cependant mutagenèse, les cellules produites peuvent être soit des « grandes », soit des « petites ». Le taux de mutation est donc inférieur à 1, et varie en fonction de la concentration : c'est la zone de mutagenèse variable. Son extension, dans une échelle de concentrations logarithmiques qui est celle que nous adoptons dans ce travail, est semblable pour toutes les substances que nous avons trouvées mutagènes, sauf la 2-amino-N-méthyl acridine, pour laquelle cette zone est beaucoup plus étendue (fig. 2).

3° Le raisonnement qui conduit à la conclusion que, dans les cas où la proportion de « petites » s'élève considérablement, il y a induction de mutation et non sélection, n'est pas valable pour la proflavine. Avec celle-ci, en effet, au bout de vingt-quatre heures, et à des concentrations toxiques, le pourcentage de « petites » ne s'élève que jusqu'à 15 p. 100 environ.

Aussi la démonstration de l'induction de la mutation par la proflavine a-t-elle été cherchée dans des « expériences en fonction du temps ». (Cf. p. 202.)

Dans le tableau II sont réunis les résultats d'expériences effectuées aux concentrations de 1/100 000 et de 1/150 000.

On y voit que, pendant plusieurs heures, l'effectif des « grandes » reste stationnaire ou même décroît, alors que celui des « petites » augmente. Cette augmentation est telle que, si la sélection était en cause, il faudrait admettre l'existence d'une simulation des « petites », très intense et tout-à-fait transitoire : le temps de génération des « petites » serait, pour commencer, de l'ordre de une heure, alors que le temps de génération des « grandes » dans le même milieu dépourvu de proflavine est de l'ordre de deux heures quarante minutes.

4° Si les expériences « en fonction du temps » sont indispen-

TABLEAU II. — Proflavine. Action sur BII en fonction du temps aux concentrations de 1/100 000 et 1/150 000.

1/100 000						
Heures.	0	1	2	4	6	
Grandes	2 660	2 525	2 580	1 954	1 960	
Petites	20	85	140	228	280	
1/150 000						
Heures.	0	1	2	4	7,5	52,5
Grandes	2 630	2 993	2 438	2 195	2 329	2 284
Petites	10	63	71	128	179	1 378

sables, dans le cas où le pourcentage de mutants ne subit qu'un faible accroissement, pour choisir entre les hypothèses d'induction ou de sélection de mutants, elles permettent également l'étude de l'activité mutagène et de ses rapports avec l'activité toxique. La 2-amino N méthyl acridine ayant une zone de mutagenèse variable particulièrement étendue, nous en avons fait une étude détaillée. Dans la figure 3 et le tableau III sont consignés les résultats de ces expériences. On voit tout d'abord que l'accroissement de l'effectif des « petites » est plus rapide au début des expériences que dans les dernières heures, et que cet accroissement est fonction de la concentration de l'acridine. L'effectif des « grandes » subit l'évolution inverse, et croît d'autant plus rapidement que la concentration est plus faible, c'est-à-dire que la fréquence n_p des « petites » dans la descendance des « grandes » est d'autant plus grande que la concentration est plus élevée.

On peut calculer π à l'aide de la relation

$$\pi = 2 - \sqrt{\frac{N_x}{N_0}} \quad (1)$$

où x est le nombre de bourgeons issus des « grandes » dans un certain intervalle de temps et N_0 et N_x le nombre de « grandes » au début et à la fin de cet intervalle (voir Appendice).

Le résultat de ce calcul pour les concentrations $1/10^6$ et $1/2 \cdot 10^6$ est consigné dans le tableau IV.

Pour des concentrations inférieures à celles-ci, où la proportion des « petites » est faible, la méthode employée manque de précision.

Un résultat important apparaît ici : π atteint dès les quatre premières heures sa valeur la plus élevée. L'action mutagène est pratiquement immédiate. La décroissance de π , au cours des dernières heures, est inhérente à notre méthode de calcul, car la proportion des « petites » est très grande à ce moment, de

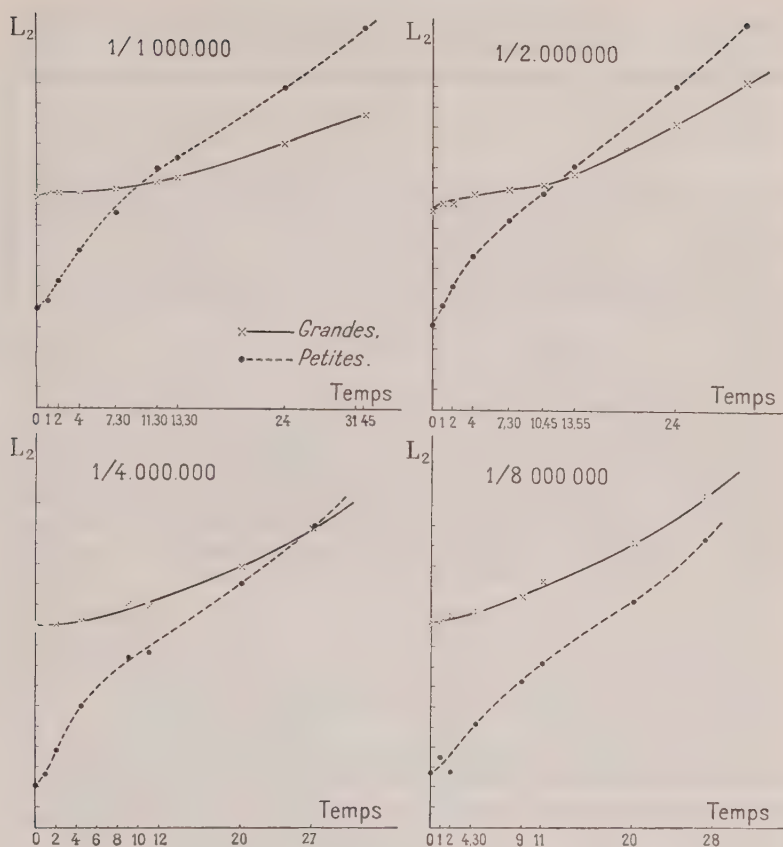


Fig. 3. — Culture de la levure BII en présence de quatre concentrations de 2 amino N méthyl acridine. Abscisses : temps en heures. Ordonnées : log de base 2 des effectifs de chaque type de cellules.

TABLEAU III. — Croissance en fonction du temps à diverses concentrations de 2-amino-N-méthyl-acridine.

Concentration $1/4.10^6$						Concentration $1/2.10^6$					
Temps	N_G	L2 grandes	N_P	L2 petites	% petites	Temps	N_G	L2 grandes	N_P	L2 petites	% petites
0	1.335	10,38	31	4,95	2,3	0	954	9,85	18	4,15	1,9
1	1.560	10,60	40	5,30	2,5	1	1.205	10,25	36	5,15	2,9
2	1.570	10,61	79	6,29	4,8	2	1.630	10,26	68	6,1	5,5
4	1.635	10,67	224	7,79	12	4	1.670	10,70	198	7,6	10,5
7,30	1.625	10,63	796	9,63	30	7,30	2.000	10,95	668	9,4	25
11,30	2.360	11,19	3.580	11,83	59	10,45	2.380	11,2	1.730	10,75	42
13,30	2.680	11,38	5.360	12,38	67	13,55	4.150	11,7	4.450	12,1	52
24	8.300	13,01	69.500	15,60	89	24	19.900	14,13	67.500	16,1	77
31,45	24.400	14,57	492.000	18,87	95	31	88.500	16,40	391.000	19,30	82
Concentration $1/4.10^6$						Concentration $1/8.10^6$					
Temps	N_G	L2 grandes	N_P	L2 petites	% petites	Temps	N_G	L2 grandes	N_P	L2 petites	% petites
0	1.045	10,02	4	2,13	0,41	0	1.174	10,19	7	2,72	0,56
1	1.056	10,04	7	2,72	0,6	1	1.314	10,36	11	3,46	0,85
2	1.108	10,11	15	3,9	1,4	2	1.439	10,57	7	2,72	0,45
4,30	1.241	10,27	66	6,04	5	4,30	1.718	10,74	35	5,13	2
9	2.230	11,12	359	9,45	14	9	2.725	11,42	156	7,28	5,4
11	2.025	10,98	428	9,67	17	11	4.980	12,27	286	8,15	5,4
20	7.858	12,54	4.570	12,13	41	20	18.856	14,2	2.464	11,26	11,6
27	30.450	14,29	31.500	14,33	51	27	97.162	16,56	21.533	14,38	18

TABLEAU IV. — Valeurs de π dans différents intervalles de temps aux concentrations $1/10^6$ et $1/2.10^6$.

CONCENTRATION	INTERVALLE DE TEMPS				
	1-4 h.	4-7 1/2 h.	7 1/2-11 1/2 h.	11 1/2-24 h.	24-32 h.
$1/10^6$	0,75	0,73	0,76	0,44	0,48
$1/2.10^6$	0,56	0,58	0,46	0,26	0,22

sorte que la contribution de la mutation des « grandes » à leur accroissement est masquée (3).

Il est donc plausible de penser que π reste constant pendant toute la durée de l'expérience. Ceci admis, nous pouvons faire une estimation, pour les divers intervalles, de temps, du temps de génération θ des « grandes », c'est-à-dire du temps qui sépare la naissance de deux bourgeons successifs, quelle que soit leur nature. x étant le nombre de bourgeons produits par une « grande » dans l'intervalle de temps $T_x - T_o$, on a :

$$\theta = \frac{T_x - T_o}{x}$$

Puisque π est connu, on peut tirer x de l'équation (1). Nous donnons dans le tableau V le résultat d'un tel calcul.

TABLEAU V. — Temps de génération θ des « grandes » (en heures), en fonction de la durée de contact avec la 2-amino-N méthyl acridine.

CONCENTRATION	INTERVALLE DE TEMPS				
	1-4 h.	4-7 1/2 h.	7 1/2-11 1/2 h.	11 1/2-24 h.	24-32 h.
$1/10^6$	44	7,5	3	2,4	2
$1/2.10^6$	8,7	5,8	4,7	2,9	2

La multiplication des « grandes », d'abord lente, s'accélère et la valeur de θ se rapproche de celle du témoin, qui est de

(3) Rappelons que dans les expériences d'Ephrussi et Hottinger [10] les premiers bourgeons formés en milieu euflaviné donnent généralement des clones de « grandes » et que la probabilité d'obtenir des cellules filles « petites » croît avec le nombre de bourgeons antérieurement produits. La différence entre ces résultats et les nôtres peut s'expliquer par les conditions très différentes de culture.

deux heures six minutes. Elle semble même la dépasser. Cependant, étant donnée la manière très indirecte dont θ a été calculé, les valeurs du tableau V ne sont que d'assez grossières approximations. Toutefois, un tel calcul met en évidence une véritable période de latence suivie d'une phase de multiplication plus rapide.

L'examen des données inscrites dans les deux tableaux précédents permet de constater que des taux de mutation différents peuvent être induits dans des conditions de vitesse de multiplication semblables, et que des taux semblables peuvent s'établir à des vitesses de croissance différentes. C'est dire que le temps que met une « grande » à produire un bourgeon est indépendant de la nature de celui-ci.

5° Nous résumerons brièvement les résultats obtenus avec les autres substances mutagènes. L'euflavine ayant fait l'objet d'une étude antérieure [7], nous en rappellerons les principaux points. Cette substance induit un taux de mutation égal à 1 à la concentration de $1/10^7$, dépourvue de toxicité. L'activité toxique ne se manifeste qu'à une concentration bien supérieure et paraît s'exercer avec la même intensité sur les « grandes » et les « petites ».

La 5-amino N méthyl acridine induit la formation d'un certain pourcentage de colonies de taille réduite aux concentrations voisines de $1/10^6$. La variabilité de la taille en est considérable, et on ne peut plus classer les colonies en normales et mutantes par le critère de la taille, car il existe tous les intermédiaires entre des grandes normales et les colonies les plus petites. Le test spectroscopique montre que la très grande majorité des colonies de taille réduite sont constituées par des cellules ayant les enzymes respiratoires normaux.

La pentaméthylpararosaniline et la pararosaniline fournissent des courbes semblables à celle de la rosaniline. Enfin, l'hexaméthylpararosaniline, qui est la plus toxique des quatre triphénylméthanés, donne une augmentation de « petites » peu accusée, quoique plus importante que celle produite par la proflavine.

Quant au bleu de méthylène et à la protamine, ils ne donnent pas lieu à un accroissement de la proportion de « petites » dans les conditions de nos expériences.

DISCUSSION.

Les résultats qui viennent d'être exposés montrent que la toxicité et l'activité mutagène sont deux propriétés distinctes qui varient de façon indépendante aussi bien au sein d'une série de substances apparentées qu'avec la concentration de chacune de celles-ci.

1° Dans la série des acridines, la toxicité apparaît essentiellement liée à la forme de la molécule.

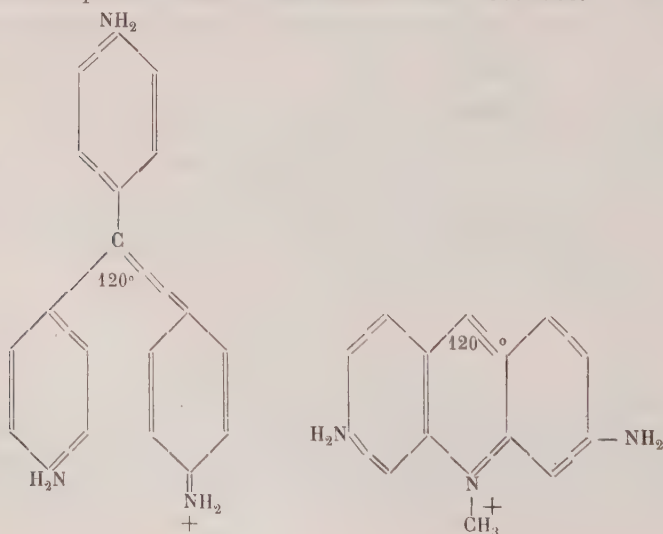
Albert et ses collaborateurs [4] ont montré que l'ionisation est un facteur d'importance capitale du pouvoir bactériostatique. Avec les levures et le critère de toxicité que nous avons choisi, l'ionisation paraît être un facteur tout à fait secondaire. Cela ressort nettement de la comparaison de 3 monoamino-acridines, isomères substitués sur les carbones 2, 3 et 5 d'après la figure 1 et le tableau 1.

Enfin, la figure 1 permet de constater que les acridines quaternaires sont plus toxiques que leurs homologues tertiaires. Il est intéressant de noter que, pour la souris, la toxicité des acridines croît beaucoup moins vite avec le degré d'ionisation que l'activité bactériostatique. Par contre, les acridines quaternaires sont beaucoup plus toxiques pour l'animal, sans que leur pouvoir antibactérien soit supérieur à celui des corps tertiaires [8].

Dans la série du triphénylméthane, le facteur qui paraît importer est le nombre de radicaux méthyl, substitués sur les amines.

2° Contrairement à la toxicité, l'activité mutagène n'est l'apanage que de quelques substances peu nombreuses, et l'on pouvait s'attendre à ce que celles-ci présentent une propriété commune très particulière.

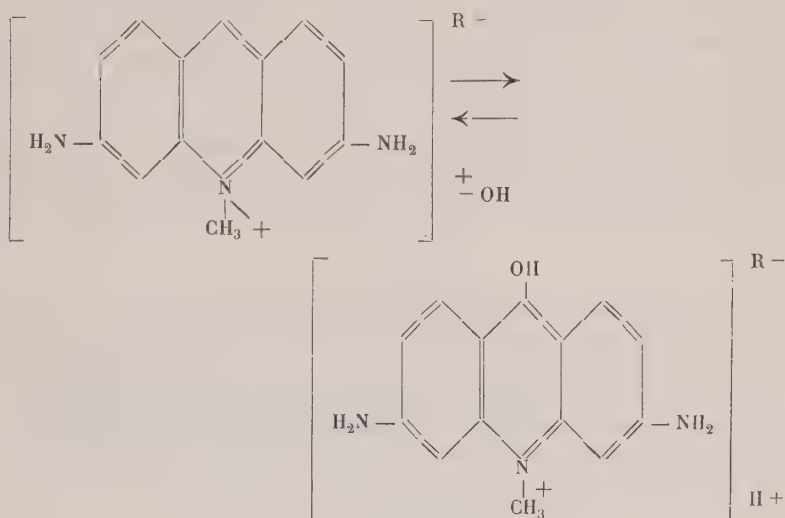
La comparaison des formules des acridines et des triphénylméthanes fait ressortir une première analogie. L'angle que forment les valences du carbone central de ces derniers est égal à 120° ; en faisant coïncider 2 cycles latéraux des triphénylméthanes avec 2 cycles des acridines, on fait coïncider le carbone central des premiers avec le carbone 5 des seconds.



L'absence du cycle azoté dans la série du tryphénylméthane élimine l'azote du noyau d'acridine comme facteur nécessaire à l'activité mutagène.

A l'exception de la proflavine, les acridines mutagènes et les triphénylméthanes basiques sont des corps quaternaires. En solution aqueuse, ils donnent deux produits successifs d'oxydation dont le premier est une hydroquinone, ou carbinol, formé par fixation d'un OH sur le carbone 5 des acridines ou le carbone central du triphénylméthane.

La réaction est la suivante :



Elle est réversible. Le niveau d'équilibre dépend du pH du milieu, ainsi que de la substance envisagée. Ainsi, pour l'eufлавine, un équilibre de 0,5 nécessite un pH de 12 et, à 25°, demande plusieurs heures pour s'établir. Etant donné que le niveau de cet équilibre baisse de dix fois pour chaque baisse d'une unité de pH, à pH 6,2, qui est celui de notre milieu de culture, la concentration de carbinol à l'équilibre est de $0,5 \times 10^{-6}$. Même si l'on suppose que le carbinol est actif à de si faibles concentrations, la lenteur de cette réaction exclut cette forme comme facteur responsable de l'activité mutagène, puisque celle-ci se manifeste dans les toutes premières heures avec son intensité la plus élevée.

L'aptitude à former un carbinol sur le carbone 5 témoigne d'une affinité plus générale pour les radicaux anioniques (Albert [9]). Il nous semble donc plausible d'admettre que l'activité mutagène dépend de l'affinité du carbone 5 pour un organite cellulaire, porteur d'un radical acide. Puisque toutes les acridines

étudiées sont des bases et puisque les plus actives du point de vue de la mutagénèse sont des corps quaternaires, on peut penser que l'approche du récepteur est conditionnée par des facteurs autres que la simple attraction électrostatique entre ions de signes contraires. L'influence des radicaux NH_2 qui favorise l'activité mutagène (l'euflavine est plus active que la 2-amino N méthyl acridine) est difficile à expliquer simplement.

L'activité mutagène de la proflavine, quoique faible, paraît s'opposer à cette interprétation. Elle pourrait cependant être considérée comme le résultat de la grande similitude stérique de ce corps avec l'euflavine, ce qui aurait pour résultat de placer son carbone 5 au voisinage du récepteur sensible. Cette région de la molécule de la proflavine possède en effet une certaine charge positive qui est toutefois moins forte que celle de l'euflavine.

Enfin, l'absence d'activité mutagène de la 5-amino N méthyl acridine peut n'être qu'apparente et due à ce que sa toxicité élevée ne permet que l'usage de concentrations très basses.

APPENDICE.

EVOLUTION D'UNE POPULATION MIXTE DE « GRANDES » ET DE « PETITES ».

Si N_0 et n_0 sont respectivement les nombres des « grandes » et des « petites » au début de l'expérience, si π est le taux de mutation et λ le taux de sélection définis p. 201, l'effectif des « grandes » devient, au bout de x générations ;

$$N_x = N_0(2 - \pi)^x \quad (1)$$

et l'effectif des « petites » :

$$n_x = n_0 \cdot 2^{\lambda x} + N_0 \frac{2^{\lambda x} - (2 - \pi)^x}{2^\lambda - (2 - \pi)}. \quad (2)$$

En combinant ces deux formules on obtient le rapport R du nombre des « petites » à celui des « grandes », soit :

$$R_x = \frac{n_0}{N_0} \left(\frac{2^\lambda}{2 - \pi} \right)^x + \frac{\pi}{2^\lambda - (2 - \pi)} \left[\left(\frac{2^\lambda}{2 - \pi} \right) - 1 \right]. \quad (3) \quad (4)$$

La façon dont R varie dépend essentiellement de $\frac{2}{2 - \pi}$

1° $2^\lambda > 2 - \pi$. R tend exponentiellement vers l'infini. Les « petites » éliminent les « grandes ».

(4) Cette formule, est la même, aux symboles près, que celle publiée dans le travail d'Ephrussi, L'Heritier et Hottinguer [5].

2° $2^\lambda = 2 - \pi$. L'expression [3] se réduit à la formule :

$$R_x = \frac{n_0}{N_0} + \frac{\pi x}{2 - \pi} \quad (4)$$

qui tend linéairement vers l'infini.

3° $2^\lambda < 2 - \pi$. R. tend vers une limite qui est :

$$R = \frac{\pi}{(2 - \pi) - 2^\lambda} \quad (5)$$

Si, au lieu de R, on considère la fréquence des « petites », f_p , on a :

$$f_p = \frac{\pi}{2 - 2^\lambda} \quad (6)$$

Cette dernière expression n'a évidemment de sens que si $\lambda < 1$, c'est-à-dire si le taux de croissance des « petites » est inférieur à celui des « grandes ».

De l'expression [4] on tire

$$\pi = 2 - \sqrt[x]{\frac{N_x}{N_0}} \quad (7)$$

π est ici une valeur moyenne pour x générations de « grandes ». Comme N_0 et N_x sont, rappelons-le, les nombres de « grandes » au début et après x générations, leurs valeurs sont directement mesurables. Le problème consiste à évaluer x .

Supposons la population homogène. Si P_0 et P_x sont les nombres de cellules au début et après les x générations, on peut écrire :

$$P_x = P_0 \cdot 2^y$$

où y est une quantité inférieure à x , puisque les « petites » ont un désavantage sélectif par rapport aux « grandes » ; y est d'autant plus voisin de x que la fraction des « petites » est plus faible.

A mesure que cette fraction augmente, l'écart avec x croît.

A noter qu'une telle approximation est inadmissible dans le cas d'une population en équilibre, car l'on aurait :

$$\frac{P_x}{N_x} = \frac{P_0}{N_0}$$

d'où

$$\frac{P_x}{P_0} = \frac{N_x}{N_0} = k \text{ et } \pi = 2 - \sqrt[k]{\log_2 k} = 0.$$

Au lieu de considérer la fréquence π des mutants dans la descendance, on peut prendre pour taux de mutation la fréquence de mutants apparus dans l'ensemble de la population au bout d'une génération. Cette dernière valeur est alors deux fois plus petite que celle de π . Elle correspond au taux de mutation tel qu'il est généralement défini.

RÉSUMÉ.

1° L'activité mutagène et la toxicité des acridines peuvent être rattachées à deux propriétés différentes de leur molécule.

2° La première paraît essentiellement dépendre d'une affinité particulière du carbone 5 à l'égard de radicaux acides de la cellule de levure.

3° La seconde semble essentiellement en relation avec la forme de la molécule prise dans son ensemble. L'ionisation, facteur d'importance capitale en ce qui concerne l'activité antibactérienne, joue ici un rôle secondaire. Dans l'ordre d'activité décroissante, on peut classer les acridines mutagènes de la manière suivante : euflavine, 2-amino N méthyl acridine, proflavine.

4° D'autres corps que les acridines sont doués d'activité mutagène : ce sont les dérivés basiques du triphénylméthane.

5° L'activité mutagène se manifeste sans latence appréciable. Elle affecte principalement la descendance des cellules normales et la vitesse de bourgeonnement de celles-ci paraît indépendante de la nature mutante ou normale du bourgeon produit.

Je tiens à remercier M. le professeur B. Ephrussi, qui m'a suggéré le sujet de ce travail, pour l'intérêt qu'il a pris à son achèvement, pour les contrôles spectroscopiques qu'il a effectués lui-même, et surtout pour les critiques serrées auxquelles il a soumis les idées développées ici.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. ALBERT, S. RUBBO, R. GOLDACRE, M. DAVEY et J. D. STONE. *Brit. J. exp. Path.*, 1945, **26**, 160.
- [2] B. EPHRUSSI, H. HOTTINGUER et A. M. CHIMENES. *Ces Annales*, 1949, **77**, 351.
- [3] P. SLONIMSKI et B. EPHRUSSI. *Ces Annales*, 1949, **77**, 42.
- [4] B. EPHRUSSI, H. HOTTINGUER et J. TAVLITZKI. *Ces Annales*, 1949, **76**, 419.
- [5] B. EPHRUSSI, Ph. L'HERITIER et H. HOTTINGUER. *Ces Annales*, 1949, **77**, 64.
- [6] B. EPHRUSSI et H. HOTTINGUER. *Nature*, 1950, **166**, 956.
- [7] M. MARCOVICH. *Ces Annales*, 1951, **81**, 452.
- [8] R. RUBBO. *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28**, 1.
- [9] A. ALBERT. *The acridines*. Edward Arnold and Co, Editors, London, 1951.
- [10] B. EPHRUSSI et H. HOTTINGUER. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology*, 1951, **16**, 75.

UNE TUMEUR FILTRABLE DE LA POULE D'UN TYPE PARTICULIER HISTIOCYTO-XANTHO-SARCOME

par AIMÉ PELLISSIER et GILBERT BORIES (*).

*(Institut Pasteur de Brazzaville
et Service de l'Elevage de l'A. E. F.)*

Nous avons observé une tumeur maligne filtrable de la poule, d'un type histologique assez particulier, et que nous pensons intéressant de rapporter.

Il s'agit d'un coq de race Sussex, âgé de 1 an environ, provenant de la ferme du Service d'Elevage de Brazzaville. Cet animal présentait une tumeur ulcérée de la cuisse droite, de la grosseur d'un œuf de cane. La tumeur est diffuse et mal limitée, siège dans les parties molles et n'adhère pas à l'os. Elle est de consistance molle. A la coupe elle paraît contenir divers éléments. On note un aspect microkystique à contenu gélatineux translucide, un aspect charnu œdémateux et enfin un aspect de couleur soufre à contours circlinés. Ces divers aspects macroscopiques sont intriqués les uns aux autres, sans systématisation.

L'autopsie de ce coq montre une généralisation de la tumeur sous forme de métastases lobulées de couleur le plus souvent bleutée, de consistance molle, siégeant dans le péritoine, le foie, la plèvre, les poumons, le péricarde. Le rein est volumineux et ne semble pas atteint macroscopiquement, mais l'examen histologique montrera cependant des métastases dans ce viscère.

L'examen microscopique, n° 1302, montre une diversité d'aspects histologiques, correspondant aux constatations macroscopiques. Les éléments les plus nombreux sont constitués par des histiocytes fusiformes, à noyau clair et vésiculeux, disposés en fascicules tourbillonnants, mais presque toujours dissociés par de l'œdème et surtout une sécrétion mucoïde. D'où des aspects d'effilochage et des aspects myxomateux. Mêlés à ces éléments, quelquefois en petit nombre, mais formant assez souvent des plages entières, on note des cellules plus volumineuses, possédant un noyau arrondi clair et nucléolé, un cytoplasme basophile globu-

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 avril 1953.

leux et bourré d'enclaves diverses, de débris et de leucocytes phagocytés. Il s'agit toujours des mêmes histiocytes, car toutes les formes de transition peuvent être observées entre les deux

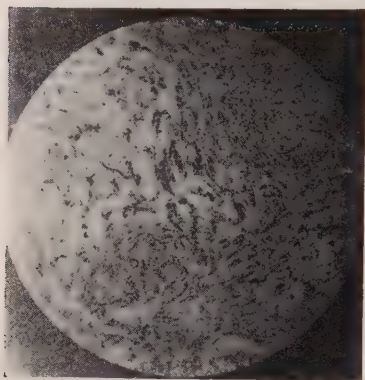


FIG. 1.

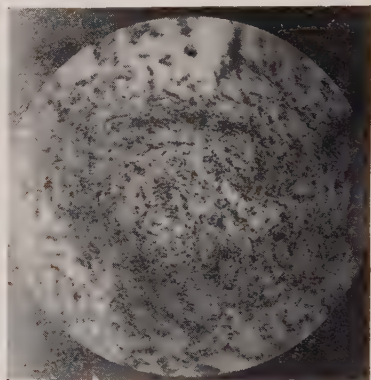


FIG. 2.

FIG. 1 et 2. — Histiocanthosarcome de la poule. Examen n° 1302.
Aspect d'histiocanthosarcome œdémateux et à tendance myxoïde.

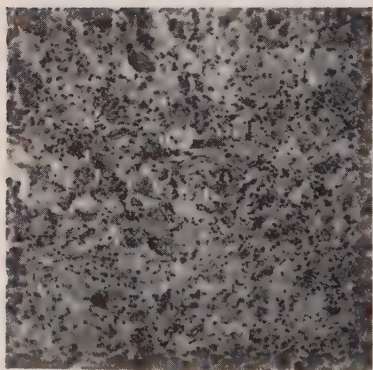


FIG. 3.



FIG. 4.

FIG. 3 et 4. — Histiocanthosarcome de la poule. Examen n° 1302. Plages formées de gros histiocytes monstrueux à caractères macrophagiques, avec réaction inflammatoire subaiguë (tumeur ulcérée en surface).

types de cellules, mais ceux-ci ont évolué vers le potentiel phagocytaire. Certains de ces éléments mesurent jusqu'à 50 microns et on compte dans certains d'entre eux jusqu'à 10 et 12 polynucléaires phagocytés.

Enfin un troisième aspect est l'évolution xanthomateuse de ces histiocytes (zone soufrée macroscopique). Ces cellules sont alors bourrées de vacuoles claires ou pigmentées de jaune brun et présentent un aspect spumeux. La différenciation va même jusqu'à la cellule géante du type Touton.

On note de nombreuses zones de nécrose et d'hémorragie. La malignité est signée, non seulement par les métastases, mais par de nombreuses monstruosité cellulaires et nucléaires.

Dans les zones d'invasion des muscles de la cuisse on note une réaction musculaire au contact de la tumeur. Quelques cellules musculaires striées deviennent globuleuses, tendent à s'isoler et évoquent les images décrites par A. Peyron [8], et sur lesquelles nous reviendrons tout à l'heure.

La structure des diverses métastases reproduit les aspects de la tumeur primitive, sauf l'évolution xanthomateuse.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.

La tumeur a été transmise d'abord par greffe, puis par filtrat. Les poules n^{os} 3 et 4 ont été inoculées dans les muscles pectoraux avec un broyat au mortier, en eau physiologique, d'une parcelle de la tumeur primitive conservée pendant huit jours en boîte de Petri à — 25°. Il s'agit donc d'une greffe.

La poule n^o 4, de race Sussex, n'a rien présenté après un an d'observation. Par contre, la poule n^o 3, de race Rhodes, a présenté au point d'inoculation un nodule apparu au trentième jour. L'animal a été sacrifié le quarante-cinquième jour. Il y avait localement une tumeur de la grosseur d'une amande, d'aspect translucide, de consistance molle. L'autopsie n'a pas montré de métastase.

L'examen de la tumeur locale, n^o 1432, a montré un aspect identique à la tumeur primitive : histiocyto-sarcome œdémateux et myxoïde, avec plages de gros histiocytes quelquefois polynucléés à potentiel macrophagique.

Une parcelle de cette tumeur greffée de la poule n^o 3 a servi au passage par filtrat sur filtre Seitz aux poules 5 et 6. Nous avons effectué un broyat en eau physiologique de matériel conservé onze jours en boîte de Petri à — 25°. L'émulsion a été filtrée sur filtre Seitz EK. Inoculation dans les muscles pectoraux.

La poule n^o 5, n'ayant rien présenté localement, a été sacrifiée après trois mois. L'autopsie n'a rien révélé, ni localement, ni dans les organes internes.

La poule n^o 6, de race Rhodes, a présenté trois mois environ après l'inoculation un petit nodule local qui a été extirpé chirurgicalement. L'examen, n^o 1646, a montré qu'il ne s'agissait que d'un nodule inflammatoire chronique. Quelques mois plus tard

cet animal a présenté un amaigrissement progressif. Il a été sacrifié huit mois après l'inoculation. L'autopsie n'a rien décelé au niveau du point d'inoculation, n'a pas mis de métastase en évidence dans les organes mais a permis de constater un gros foie jaune chamois. Ajoutons qu'une lame de sang a montré une formule normale. L'examen microscopique, n° 2047, a décelé dans les muscles pectoraux un petit nodule diffus ayant les caractères de la tumeur primitive. Le foie était atteint d'une stéatose massive à grosses gouttes, sans signes de leucose aviaire ni de métastase tumorale. Nous devons conclure de ce résultat à la positivité de la transmission par filtrat et regretter qu'une affection intercurrente n'ait pas permis le développement plus avancé de la tumeur transmise.

Le virus de cette tumeur de la poule a malheureusement été perdu, car nous n'avons pas conservé une partie de cette masse musculaire, qui ne présentait pas macroscopiquement de tumeur.

DISCUSSION.

Les tumeurs filtrables de la poule ont donné lieu à de nombreux travaux, et si nous nous reportons à la monographie de J. Nicolai [6] et à l'article de J. Lafforet-Furiet [3], nous voyons que depuis 1910, date de la publication du premier cas de sarcome transmissible de la poule par Peyton Rous [41], les observations publiées peuvent être groupées dans six types différents.

Les tumeurs à type de sarcome fusiforme ou fibro-sarcome, dont le cas princeps de Peyton Rous [41], ont été décrites par Pentimalli [7], par A. Peyron [10] et par Begg [4].

Les tumeurs à type de myxosarcome ont été décrites par Peyton Rous [42]. Il s'agissait, dans ce cas particulier, de l'aspect produit par la greffe de sa tumeur princeps. La même année c'est un myxosarcome que rapportent les auteurs japonais Fujinami et Inamoto [2].

Les tumeurs à type d'ostéo-chondro-sarcome ont été décrites par Rous, Murphy et Tytler [13], par Tytler [17] et par le japonais Muto [5].

Le type de sarcome polymorphe a été rapporté par l'auteur allemand Teutschlaender [16] et étudié par A. Peyron dans des cas publiés par J. Nicolai [6].

Plus intéressante encore est la tumeur publiée par P. Rous et B. Linda-Lange [44] en 1913. Les auteurs en ont fait un sarcome conjonctif, mais la tumeur présentait le caractère particulier de donner des métastases presque uniquement dans les masses musculaires striées ou lisses. Aussi A. Peyron [9], ayant repris cette étude à l'occasion de tumeurs musculaires, était-il d'avis qu'il s'agissait d'un sarcome musculaire.

Nous en venons enfin à la tumeur décrite par Murray et

Begg [4], avec laquelle le cas que nous rapportons présente quelques analogies. Il s'agissait d'un coq présentant une multitude de petites masses grisâtres péritonéales. La tumeur avait l'aspect d'un sarcome polymorphe, mais les passages ont révélé des caractères permettant de la considérer comme un endothéliome. Les auteurs signalent de plus une phase évolutive avec cellules volumineuses macrophagiques. Cette tumeur a fait l'objet d'une étude de Roussy, Oberling et Guérin [15] qui ont confirmé la description des auteurs anglais. L'histogénèse de cette tumeur doit être recherchée dans des éléments mésenchymateux très jeunes, puisqu'ils font preuve d'un potentiel évolutif considérable, et les auteurs proposent la dénomination d' « hémohistio-blastome ».

Le cas que nous rapportons a une origine similaire, mais cependant les éléments qui le composent présentent le potentiel évolutif de cellules plus avancées dans la différenciation. Ils nous paraissent présenter les caractères de l'histiocyte, dont ils mettent en évidence la mobilité et la macrophagie. C'est pourquoi le diagnostic d' « histioxanthosarcome » nous paraît devoir convenir.

En résumé nous rapportons l'observation d'une tumeur conjonctive maligne de la poule dont nous avons pu obtenir la transmission par greffe et par filtrat. Les caractères histologiques de cette tumeur permettent de la désigner sous le nom d' « histioxanthosarcome ».

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. M. BEGG. *Brith. J. exp. Path.*, 1927, 147, et *Lancet*, 1927, 4, 912.
- [2] A. FUJINAMI et K. INAMOTO. *Gann* (Jap.), 1911, 5, 13.
- [3] J. LAFFORÊT-FURIET in C. LEVADITI et P. LÉPINE. *Les ultravírus des maladies animales*. Maloine, éditeur, Paris, 1943, 1036-1078.
- [4] A. MURRAY et A. M. BEGG. *Ninth Sci. Rep. Inst. Cancer Research.*, Londres, 1930.
- [5] MUTOO. *Verh. ap. Gesell. Path.*, 1915, 127.
- [6] J. NICOLAÏ. *Etude expérimentale des tumeurs spontanées chez les oiseaux*. Le François, édit., Paris 1932.
- [7] F. PENTIMALLI. *Rendiconti del. R. Accad. dei. Lincei*, 1916, 25.
- [8] A. PEYRON. *Bull. Assoc. Cancer*, janvier 1921.
- [9] A. PEYRON. *Bull. Assoc. Cancer*, novembre 1921.
- [10] A. PEYRON. *Bull. Assoc. Cancer*, novembre 1926.
- [11] P. ROUS. *J. exp. Med.*, 1910, 12, 305.
- [12] P. ROUS. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1911, 56, 1.
- [13] P. ROUS, J. B. MURPHY et W. H. TYTLER. *J. Am. Med. Assoc.*, 1912, 59.
- [14] P. ROUS et B. LINDA-LANGE. *J. exp. Med.*, 1913, 18, 651.
- [15] D. G. ROUSSY, Ch. OBERLING et M. GUÉRIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, 110, 473.
- [16] O. TEUTSCHLAENDER. *Beitr. Path. Anat.*, 1921, 69, 489.
- [17] W. H. TYTLER. *J. exp. Med.*, 1913, 17, 466.

VARIATIONS DU pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE INOCULÉ DE VIRUS GRIPPAL : CULTURE DU VIRUS DANS UN LIQUIDE ALLANTOÏQUE LÉGÈREMENT ACIDE

par B. FAUCONNIER.

[*Institut Pasteur. Centre national de la Grippe.*
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE ()*.]

Dans une communication précédente [1], nous avons montré dans quelles conditions on pouvait s'assurer de l'infection d'un liquide allantoïque d'œuf embryonné, inoculé de virus grippal quelques jours auparavant, par la simple étude du pH de ce liquide. Les œufs embryonnés de 14 jours, incubés à 38°, étaient inoculés indistinctement quel que soit le pH du liquide allantoïque. Il nous a paru intéressant de pousser un peu plus loin l'étude des variations du pH du liquide allantoïque infecté, en particulier dans les liquides présentant au départ un pH inférieur à 7, c'est-à-dire légèrement acide.

L'étude présente, qui utilise non pas des moyennes d'œufs mais des œufs pris individuellement, porte donc sur les points suivants :

1° Dans quelle mesure le virus grippal peut-il se développer quand il est inoculé dans un liquide allantoïque à réaction acide ?

2° Si le développement a lieu, quelles sont les variations concomitantes du pH du liquide ?

3° Si variations il y a, à quel moment du développement du virus commencent-elles à apparaître ?

4° Quelles sont les relations possibles entre la valeur du pH du liquide allantoïque et le début de la présence du virus telle qu'elle peut être déterminée par l'hémo-agglutination ?

5° Comparaisons entre les courbes de pH obtenues par l'infection du liquide allantoïque avant la chute de son pH d'une part, et au moment précis de cette chute d'autre part.

MATÉRIEL UTILISÉ.

1° Une souche de virus grippal A-PR8 diluée en bouillon stérile à 10^{-6} et dont le titre infectant sur œuf est d'environ 10^{-8} .

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 avril 1953.

2° Des œufs embryonnés de 15 jours, incubés à 38° et sélectionnés de manière à ne garder que ceux dont le pH allantoïque est inférieur à 7.

TECHNIQUE EMPLOYÉE.

A l'âge de 15 jours, la moitié environ des œufs incubés à 38° présente un pH allantoïque acide. Pour déterminer ce pH, on ponctionne aseptiquement quelques gouttes de liquide allantoïque avec une seringue montée sur une aiguille spéciale. La technique de ponction est celle décrite par Green et Freyman [2] pour l'étude des courbes de croissance du virus grippal dans des œufs pris individuellement. Elle utilise en particulier une aiguille spéciale présentant, outre son orifice terminal, 3 petits orifices supplémentaires étagés sur ses parois latérales.

Les quelques gouttes de liquide recueillies (0,25 à 0,30 cm³) sont déposées dans un tube de Kahn et le pH est mesuré avec un pH-mètre électrique (Heito) muni d'une micro-électrode.

Toutes les mesures ultérieures du pH du liquide allantoïque infecté sont pratiquées de la même manière. Les œufs ainsi sélectionnés, dont le pH varie de 5,5 à 6,7, sont inoculés à la même heure par voie allantoïque. Chacun reçoit 0,1 cm³ d'une dilution de virus à 10⁻⁶. L'ensemble est placé à l'étuve à 35° et ponctionné aseptiquement comme il a été dit plus haut, dix-huit, vingt-deux, vingt-quatre, quarante-deux et soixante-six heures après inoculation. A chaque ponction, un contrôle de stérilité bactérienne est pratiqué. Les œufs morts ou contaminés sont jetés. La présence du virus est recherchée par l'hémo-agglutination après chaque ponction et dans chaque liquide à la suite de la détermination du pH.

Après la dernière ponction (soixante-sixième heure), 11 œufs restent encore vivants et indemnes de toute contamination bactérienne. C'est sur ce lot type que nous baserons notre étude. L'expérimentation présente, qui ne porte que sur 11 œufs, peut paraître manquer de fond au point de vue du nombre d'œufs utilisés, mais elle n'est qu'un type parmi bien d'autres études analogues où des séries de 20 à 30 œufs ont été suivies de la même manière. Car il va de soi que l'on ne peut ponctionner et tester avec toutes les précautions requises de stérilité bactérienne et en respectant un horaire précis, un plus grand nombre d'œufs à la fois. Ainsi, toutes les autres séries d'expérimentation ont montré la constance absolue des résultats obtenus (décrits plus loin). Leur suppression apporte simplement une clarté plus grande à l'exposé.

RÉSULTATS OBTENUS (tableau I et fig. 1).

1° DÉVELOPPEMENT DU VIRUS GRIPPAL DANS UN LIQUIDE ALLANTOÏQUE LÉGÈREMENT ACIDE. — Sur les 11 œufs inoculés, 4 se sont révélés

TABLEAU I. — Valeurs individuelles de pH.
HA, hémo-agglutination.

OEUF		HEURE 0	HEURE 18	HEURE 22	HEURE 24	HEURE 42	HEURE 66
1	pH HA	6,7 0	6 0	6 0	6 0	6,4 +	6,7 +
2	pH HA	6,6 0	6 0	6,1 0	6,3 +	6,6 +	7,4 +
3	pH HA	6,6 0	6,3 0	6,5 +	6,6 +	6,7 +	7,2 +
4	pH HA	6,5 0	5,7 0	5,7 0	5,7 0	5,6 0	5,6 0
5	pH HA	6 0	5,9 0	5,8 0	5,7 0	5,7 0	5,4 0
6	pH HA	6,6 0	6 0	5,9 0	5,9 0	6 0	6,6 +
7	pH HA	6,5 0	6,2 0	6,2 0	6,1 0	6,6 +	7,2 +
8	pH HA	6,4 0	6,4 0	6,6 +	7 +	7 +	7 +
9	pH HA	6,6 0	6,4 0	6,6 +	6,6 +	7,2 +	7,6 +
10	pH HA	6 0	5,9 0	5,9 0	5,9 0	5,9 0	5,6 0
11	pH HA	6 0	6 0	6 0	6 0	5,7 0	5,7 0

réfractaires à la culture du virus (nos 4, 5, 10 et 11) ; en particulier, les 3 œufs dont le pH du liquide allantoique était à 6 sont restés indemnes de l'infection. Le quatrième œuf (n  4) avait un pH de départ de 6,5, mais il est remarquer que c'est l'œuf dont la pente de pH est la plus forte au cours des premières heures puisqu'à dix-huit heures le pH est à 5,7.

Quant aux 7 œufs (nos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9) dont le pH variait au moment de l'inoculation de 6,4   6,7, ils se sont montrés réceptifs à l'infection. D'après ces résultats, on peut déduire que le virus est capable de se développer dans un liquide légèrement

acide. Le pH le plus bas compatible avec ce développement semble être au voisinage de 6. Cependant ce qui paraît le plus important, ce n'est pas la valeur du pH du liquide allantoïque au moment de l'inoculation, mais bien plutôt sa valeur au début de la multiplication active du virus. L'œuf n° 4 en est un exemple : son pH allantoïque à 6,5 au moment de l'inoculation n'est plus qu'à 5,7 dix-huit heures après le début de l'infection, c'est-à-dire à l'heure où d'habitude le virus commence à se développer activement ; par la suite cet œuf s'est montré indemne de toute infection ; au moment où le virus devait se développer le pH était trop bas pour permettre cette multiplication. Au contraire, l'œuf n° 7 inoculé au même pH (6,5) présentait encore un pH de 6,2 à dix-huit heures ; il s'est montré ensuite réceptif à l'infection, mais plus tardivement. Les relations entre la valeur du pH du liquide allantoïque et le début de la multiplication active du virus seront discutées plus loin.

2° VARIATIONS DU pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE INOCULÉ DE VIRUS GRIPPAL. — Pendant un temps plus ou moins long après inoculation, le pH du liquide allantoïque continue à descendre ; puis il remonte d'une manière caractéristique chez tous les œufs dont le liquide se révèle infecté de virus. Cette remontée de la courbe du pH est variable en intensité, mais elle est constante et absolument caractéristique de l'infection du liquide et permet de la déterminer en l'absence de tout test d'hémo-agglutination si on a pris soin de noter la valeur du pH à la quinzième heure après inoculation, c'est-à-dire juste avant la multiplication active du virus.

Cette méthode, basée sur l'inoculation d'œufs dont le pH allantoïque est en pleine chute (œufs de 14 ou 15 jours, incubés à 38° et sélectionnés pour rechercher les pH compris entre 6 et 7) permet d'étudier d'une manière beaucoup plus précise les variations du pH allantoïque après inoculation. Il existe en effet un véritable temps de latence de plusieurs heures qu'il est pour ainsi dire impossible d'apprécier si l'on étudie des œufs plus jeunes dont le pH allantoïque, voisin de 8, subit peu de variations. Pendant ce temps de latence, le pH continue à décroître comme le fait celui d'œufs normaux.

3° MOMENT DE LA REMONTÉE DU pH PAR RAPPORT A LA MULTIPLICATION DU VIRUS. — C'est dès le début de la phase active de multiplication du virus que le pH du liquide allantoïque cesse de décroître et commence à remonter. L'examen de la figure 1 montre que lorsque le liquide allantoïque contient assez de virus pour qu'il puisse produire une hémo-agglutination décelable, le pH de ce liquide accuse un début d'augmentation. Il s'agit donc

bien là, non pas d'un contre-coup du développement du virus, mais d'un phénomène lié intimement à sa multiplication.

4° RELATIONS ENTRE LA VALEUR DU pH ET LE DÉBUT DE LA MULTIPLICATION ACTIVE DU VIRUS. — Nous avons vu que pendant la période de latence précédant la multiplication active, le pH continuait à descendre. Le temps de latence paraissait d'autant plus long que le pH était bas au moment de la multiplication active. Des expériences répétées n'ont pas confirmé cette hypothèse pour

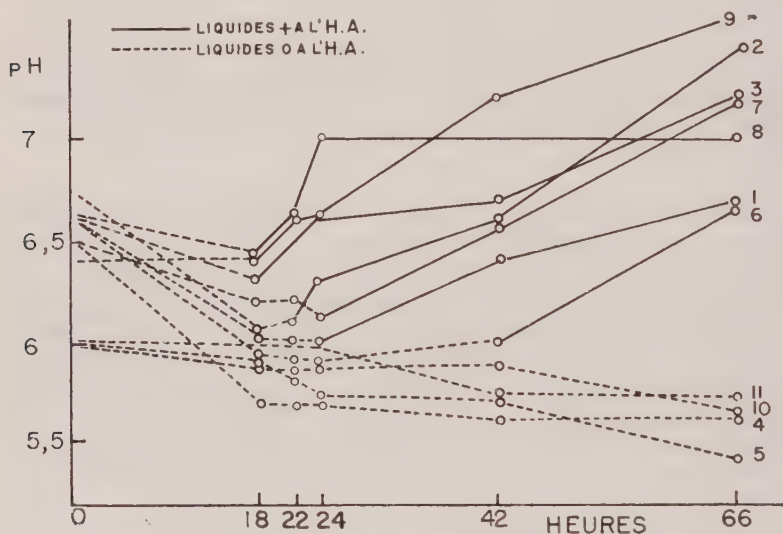


Fig. 1. — Courbes individuelles de pH; HA = hémagglutination.

tous les œufs dont le pH allantoïque était supérieur à 6,5. Cependant les examens ont montré d'une façon constante que pour des valeurs de pH allantoïque voisines de 6, qu'on pourrait appeler valeurs critiques, le temps de latence était bien plus prolongé, pouvant s'étendre sur plusieurs jours. En bref, à ce pH critique, ou bien le virus ne se développe pas, ou bien il ne se développe qu'au bout de quarante, soixante et même quatre-vingt-dix heures après inoculation au lieu de dix-huit à vingt-quatre heures normalement. L'œuf n° 6 de la figure 1, qui n'a montré un début d'hémagglutination qu'entre la quarante-deuxième et la soixante-sixième heure, en est un exemple.

Au-dessus de pH 6,5 d'autres phénomènes entrent en ligne de compte; en particulier la dose de virus inoculée, dose qui, comme on sait, influe également sur la période de latence du

développement. Toutefois, pour une même dose de virus inoculée, le début du développement actif du virus peut être aussi précoce dans un liquide à pH 7 que dans un liquide à pH 8.

5° COMPARAISON ENTRE LES COURBES DE pH OBTENUES PAR INFECTION DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE AVANT LA CHUTE DE SON pH D'UNE PART, ET D'AUTRE PART AU MOMENT PRÉCIS DE CETTE CHUTE. — Elles sont résumées dans la figure 2.

Si nous inoculons des œufs de 12 à 13 jours dont le pH est encore élevé (au voisinage de pH 8), nous obtenons la courbe n° 1.

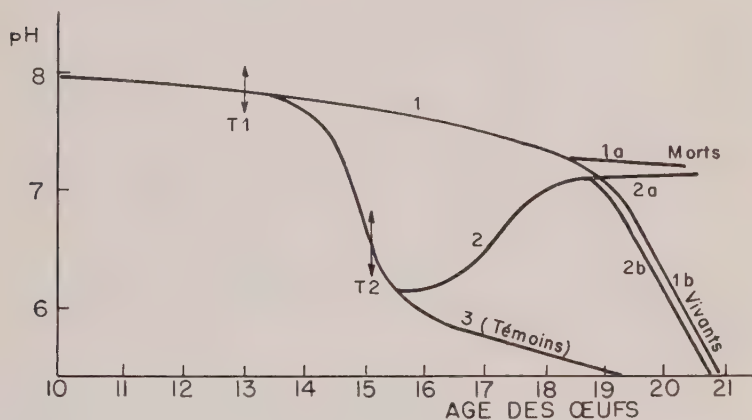


FIG. 2. — Variations générales du pH suivant le moment de l'inoculation : T1 ou T2.

La chute normale et brutale du pH allantoïque ne se produit pas dans les œufs infectés ; le pH moyen varie peu et finit par descendre aux alentours de 7,5. Si au contraire nous inoculons les œufs alors que le pH allantoïque est en pleine chute (au voisinage de pH 6,5), nous obtenons la courbe n° 2 qui accuse une remontée l'amenant en fin de compte à une hauteur voisine de la courbe n° 1. Il est à noter ici que les embryons infectés ne meurent pas tous dans les jours suivants (courbes 1 a et 2 a). Certains arrivent au vingt et unième jour prêts à éclore et dans les derniers jours le pH du liquide allantoïque, aussi bien dans le cas 1 que dans le cas 2, accuse une nouvelle chute brutale qui semble ainsi témoigner de la guérison de l'embryon (courbes 1 b et 2 b). Les différentes courbes de la figure 2 résument toutes les variations possibles du pH du liquide allantoïque suivant le moment où l'on procède à son inoculation, la courbe n° 3 représentant les œufs non inoculés ou indemnes de toute infection.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.

Un point important à signaler tout d'abord est l'explication de la négativité de certains liquides allantoïques pourtant inoculés de doses relativement importantes de virus. On remarque souvent, lors de passage d'une souche de laboratoire sur une série d'œufs embryonnés, qu'un ou deux liquides n'agglutinent pas les globules rouges. Si le virus ne s'est pas développé, il y a tout lieu de croire que c'est à cause d'un pH allantoïque trop acide et inférieur à 6. D'où l'intérêt, si l'on veut obtenir 100 p. 100 d'œufs infectés, de ne pas inoculer des œufs incubés à 38° âgés de plus de 12 jours. Le fait était connu depuis longtemps, mais l'explication n'était pas donnée; nous pensons qu'il peut être ainsi expliqué. Cette remarque est plus valable encore si l'on cherche à adapter à la voie allantoïque une souche de virus récemment isolée.

Ajoutons ici que Romanoff et Hayward [6] ont montré que la chute du pH allantoïque des œufs normaux est plus précoce si les œufs sont incubés à 39°5 au lieu de 37°5. C'est là un phénomène important dont il faut tenir compte, car une différence de 2° dans la température d'incubation peut amener une chute moyenne du pH deux jours plus tôt, si bien que même à 11 jours on peut déjà avoir des œufs dont le pH allantoïque est incompatible avec l'infection.

De plus, l'ensemble des résultats obtenus demande une explication: quelle est la cause de cette remontée du pH dans les liquides allantoïques infectés de virus. S'agit-il d'une libération massive de protéines à partir des cellules éclatées de la membrane chorio-allantoïque, protéines qui joueraient le rôle de tampon? Y a-t-il libération de produits basiques non protéiniques? Ou bien l'action toxique du virus sur l'embryon se manifeste-t-elle ainsi immédiatement en perturbant le métabolisme normal de cet embryon qui ne libère plus de substances acides abaissant normalement le pH (acide urique en particulier)?

La question est complexe. Peut-être plusieurs facteurs interviennent-ils en même temps. Cependant il faut noter que, comme le montre la figure 2, quelle que soit la valeur du pH à laquelle les œufs sont inoculés, on aboutit toujours à un pH voisin de 7,5 (variant entre 7,3 et 7,7), quatre ou cinq jours après inoculation. Il n'y a donc pas une remontée du pH parmi les œufs inoculés à pH 8 ou 8,5, mais au contraire une chute faible et progressive jusqu'à 7,5. La remontée du pH ne se produit que pour les œufs dont le pH avant inoculation est inférieur à 7,2. Il semble donc y avoir un effet tampon. Une substance serait libérée dans le liquide allantoïque, substance qui tamponnerait celui-ci aux environs de pH 7,5. Mais l'existence de cette substance

tamponnante (protéines des cellules chorio-allantoïques par exemple) s'explique mal si on considère les courbes 1 b et 2 b de la figure 2, courbes qui montrent une nouvelle et forte production d'acides non neutralisés par le liquide allantoïque. Toutefois l'augmentation des protéines dans le liquide allantoïque infecté par rapport au liquide allantoïque normal est une chose connue [3, 4].

D'autre part, des auteurs argentins ont recherché les variations de la teneur en certaines substances des liquides allantoïques infectés et normaux. Papalardo [5] a trouvé, en particulier dans le liquide infecté, une nette diminution de l'acide urique ainsi qu'une notable augmentation de créatinine, phénomènes susceptibles tous deux de limiter la chute du pH normal, sinon de faire remonter ce pH.

Quoi qu'il en soit, le problème reste ouvert. Pour le résoudre il faudrait rechercher et doser dans le même œuf les différentes substances du liquide allantoïque, une première fois vers la quinzième heure et une seconde fois vers la quarantième heure après inoculation.

RÉSUMÉ.

L'étude de l'inoculation du virus grippal dans un liquide allantoïque d'œuf embryonné dont le pH est légèrement et naturellement acide montre que :

1° Le virus peut se développer si le pH est supérieur à 6. Au voisinage de pH 6, l'infection est inconstante et au-dessous de pH 5,7 elle est exceptionnelle et très tardive.

2° Si l'infection se produit, le pH du liquide allantoïque remonte d'une façon caractéristique jusqu'aux alentours de pH 7,5 ; si l'infection n'a pas lieu, le pH continue à descendre.

3° La remontée du pH ne débute qu'au moment de la multiplication active du virus.

4° La cause de cette élévation du pH est encore mal définie et demanderait des études chimiques complètes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. FAUCONNIER. *Ces Annales*, 1953, **84**, 474.
- [2] R. H. GREEN et M. W. FREYMAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 476.
- [3] E. D. KILBOURNE et F. L. HORSEFALL. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 708.
- [4] A. KOCH, S. HORVATH et G. IVANOVICS. *Acta Physiol. (Budapest)*, 1951, **4**, 525.
- [5] M. H. PAPALARDO. *Rev. Inst. Bact. Malbran*, 1949, **14**, 16.
- [6] A. L. ROMANOFF et F. W. HAYWARD. *Biol. Bull.*, 1943, **84**, 141.

STRUCTURE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

II. — MODE D'ACTION DE LA RIBONUCLÉASE INFLUENCE DE SES CONDITIONS D'ACTION SUR LE REMANIEMENT POSSIBLE DES LIAISONS INTERNUCLÉOTIDIQUES DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

par P. VIGNAIS.

(*Institut Pasteur. Service de Chimie Biologique*
[professeur MACHEBOEUF].)

L'étude précédente [1] nous a montré que les divers polymères qui constituent une préparation brute d'acide ribonucléique se comportent différemment vis-à-vis de la ribonucléase. Une certaine fraction de polynucléotides de hauts poids moléculaires reste inattaquée.

Cependant, une proportion appréciable est dégradée. Il est vraisemblable que cette dégradation se fasse par rupture de liaisons primaires internucléotidiques. Il nous a paru intéressant de nous attacher à ce problème. Nous avons voulu plus particulièrement montrer l'importance des conditions d'action de la ribonucléase sur la nature des liaisons rompues ou remaniées.

Des électrotitrations ont été réalisées sur des hydrolysats enzymatiques de hauts polymères d'acide ribonucléique. Ces polymères ont été obtenus en traitant un volume de solution nucléique à 7,5 mg/ml par un volume d'acide acétique. Le précipité formé est dissous dans une solution très diluée de bicarbonate de sodium, le pH étant ainsi amené à 5,6 ; par addition d'alcool absolu on sépare l'A. R. N. sous forme de ribonucléate de sodium (échantillon N₃).

Les hydrolyses ont été conduites suivant des conditions diverses. Les mesures de pH furent effectuées à 18° C au moyen d'une électrode de verre. La variation en millivolts pour une unité de pH à 18° C est de 58 millivolts.

Le vase contenant la solution à titrer est recouvert d'une membrane de caoutchouc où sont ménagées des ouvertures pour le passage des électrodes, de la pointe de la burette de titration, des tubes d'arrivée et de sortie d'azote. Les titrations se font,

en effet, sous courant d'azote purifié, évitant ainsi toute action acidifiante de l'anhydride carbonique de l'air.

Nous avons utilisé des solutions alcalines ou acides N/10 ou N/12,5. Nous ne pensons pas que la faible quantité de liquide réactif ajoutée puisse faire intervenir une correction sur la valeur des équivalents soude. Les résultats sont exprimés en équivalents soude (E. S.) par tétranucléotide.

Le nombre d'équivalents soude est égal au rapport :

$$\frac{\text{Nombre de molécules de Soude}}{\text{Nombre de tétranucléotides d'A.R.N.}}$$

Soient :

X ml la quantité de soude au titre T utilisé.

p le poids en milligrammes d'A. R. N.

r le rapport entre la quantité de phosphore calculée et sa valeur théorique : 95,5 p. 100,

Le poids moléculaire d'un tétranucléotide étant pris égal à 1 285.

$$E. S. = \frac{X.T.4/1\ 000}{p.95,5/100.4/1\ 285.4/1\ 000}$$

EXPÉRIENCE I. — Nous avons déterminé les courbes d'électro-titration :

1° D'une solution nucléique témoin sans ribonucléase (20 mg de hauts polymères d'acide ribonucléique de levure dissous dans 5 ml d'eau bidistillée) ;

2° D'un hydrolysats nucléique obtenu de la façon suivante : action de 500 microgrammes de ribonucléase sur 14 mg de hauts polymères dissous dans 5 ml d'eau bidistillée, à 38°, pendant quarante-huit heures. Le pH initial était de 5,61.

Des contrôles nous ont prouvé que la faible masse de ribonucléase introduite ne trouble pas l'électro-titration.

Quarante-huit heures après le début de l'hydrolyse, le pH est tombé à 4,88. Nous effectuons alors une titration par de la soude N/10 en notant le pH à chaque addition d'alcali. Les résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux I et I bis.

Pour une raison d'ordre pratique, l'origine des ordonnées pour les équivalents soude a été choisie à pH 5,61. C'est à ce pH qu'a été commencée l'hydrolyse de l'acide nucléique.

D'autre part, nous avons voulu étudier l'action des alcalis dilués sur les liaisons internucléotidiques de l'acide ribonucléique préalablement traité par la ribonucléase. En conséquence, nous avons effectué sur l'hydrolysats enzymatique d'A. R. N. une titration retour après un séjour de dix minutes à pH 9,38.

En comparant les courbes d'électro-titration directe sur la solution témoin et sur l'hydrolysats, nous constatons :

1° Qu'entre pH 5 et 6,5 ces courbes sont parallèles ;

TABLEAU I. — A. R. N. Témoin.

NaOH N/10 en ml	ÉQUIVALENTS SOUDE	pH
0	— 0,67	4,32
0,02	— 0,34	4,55
0,04	— 0,41	4,75
0,07	— 0,20	5,15
0,10	0	5,61
0,13	0,20	6,08
0,16	0,41	6,75
0,18	0,54	7,44
0,20	0,67	8,0
0,22	0,80	8,50
0,24	0,92	8,90
0,26	1,05	9,23

TABLEAU I bis. — Hydrolysât d'A. N. R.

E. S	pH (titration directe)	pH (titration retour)
0	4,88	5,10
0,20	5,40	5,48
0,40	5,88	5,78
0,58	6,26	6,09
0,77	6,66	6,30
0,87	6,90	6,42
0,96	7,16	6,54
1,05	7,41	6,71
1,15	7,67	6,90
1,24	7,95	7,07
1,34	8,23	
1,44	8,42	7,76
1,63	8,81	8,44
1,82	9,06	8,88
2,20	9,38	9,30

2° Qu'au-dessus de pH 6,5, s'amorce une divergence qui s'accroît à mesure que le pH s'élève.

Cet écart entre les deux courbes correspond vers pH 7,5 à 0,57 E. S. et vers pH 9,2 à 0,95 E. S.

Par ailleurs, si nous comparons la courbe de titration directe — « 2 » — effectuée sur l'hydrolysât avec la courbe de titration en retour — « 3 » — obtenue après action alcaline sur cet hydrolysât, nous observons au-dessous de pH 9 une divergence qui va en s'accroissant jusqu'à pH 7. Au-dessous de pH 7, les deux courbes se rapprochent. Elles se croisent à pH 5,75 et divergent ensuite en sens inverse.

Si nous comparons maintenant la courbe de titration du témoin — « 1 » — avec la courbe « 3 », nous constatons :

1° Dès pH 5,10, une divergence qui s'accroît jusqu'à pH 7,5, mais reste constante entre pH 7,5 et pH 8,5 : elle correspond alors à 0,85 E. S. ;

2° A partir de pH 8,5, un nouvel écart entre les deux courbes qui, à pH 9,2, correspond à 1,10 E. S.

L'ensemble des résultats nous conduit aux conclusions suivantes :

I. — L'examen comparatif des courbes « 1 » et « 3 » montre deux séries de dissociations.

La première met en évidence l'apparition de groupes acides

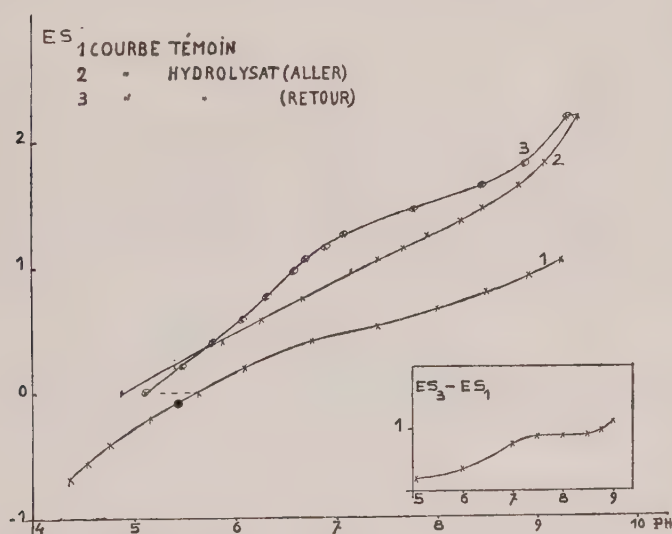


FIG. 1.

phosphoriques secondaires : en effet, leur pK se situe aux environs de 6 et leur neutralisation est terminée à pH 8.

La deuxième correspondrait à la libération de groupes énoliques des bases azotées. En effet, le pK de ces fonctions se trouve aux environs de 9,2.

II. — En fait, les divergences observées entre les courbes « 1 » et « 3 » sont le résultat de deux ordres de phénomènes :

- a) Une action enzymatique à pH 5,6 ;
- b) Une action alcaline à pH 9,38.

De quelle façon peut-on envisager le processus de cette hydrolyse ?

Sous l'influence de la ribonucléase à un pH relativement bas, se produiraient deux phénomènes différents :

1° Une rupture de liaisons esters : abaissement du pH par libération de fonctions acides phosphoriques ;

2° Un remaniement de certaines liaisons internucléotidiques. Une partie des liaisons esters (phosphate-ribose) se transposerait en liaisons phosphates d'amine.

Ceci expliquerait :

La faible dissociation dans la région des acides phosphoriques secondaires (courbe « 2 ») ;

L'apparition de dissociations nouvelles lors de la titration « retour » sur l'hydrolysate enzymatique. En effet, les liaisons phosphates d'amine, à un pH alcalin de l'ordre de 9,2, seraient rompues et libéreraient :

a) Des acides phosphoriques secondaires mis en évidence de pH 8 à pH 6 ;

b) Des groupes aminés des bases azotées qui rendent compte de l'élévation du pH final par rapport au pH initial.

Nous avons pensé que les conditions d'hydrolyse étaient d'une importance capitale et que leur variation entraînait des changements appréciables dans les caractères de l'hydrolysate et la nature des liaisons rompues. C'est pourquoi nous avons effectué une autre expérience suivant un protocole différent.

EXPÉRIENCE II. — La solution témoin contient 18 mg de hauts polymères d'A. R. N. dissous dans 10 ml d'eau bidistillée. Une autre solution contient les mêmes proportions d'A. R. N. et, en outre, 1 mg de ribonucléase ; le tout dissous dans 10 ml d'eau bidistillée.

La quantité de ribonucléase utilisée est donc plus élevée que dans l'expérience précédente. De plus, ici, l'hydrolyse se fait à 50°, pendant une durée de cinq heures. Le pH initial était de 5,78. Nous avons suivi la chute du pH au cours du processus d'hydrolyse.

TEMPS en minutes	pH
0	5,78
5	5,32
30	5,24
240	5,13
300	5,12

Après cinq heures, l'hydrolyse a donc atteint sa limite. Nous procédons alors à l'électrotitration de la solution hydrolysée par de la soude N/12,5 (tableaux II et II bis).

TABLEAU II. — A. R. N. Témoin.

NaOH N/12,5 en ml	E. S.	pH
0	1,32	3,90
0,02	1,20	4,0
0,04	1,08	4,10
0,06	0,96	4,21
0,08	0,84	4,35
0,10	0,72	4,52
0,12	0,60	4,69
0,14	0,48	4,90
0,16	0,36	5,09
0,18	0,24	5,29
0,20	0,12	5,50
0,22	0	5,78
0,24	0,12	6,16
0,26	0,24	6,59
0,28	0,36	7,09
0,30	0,48	7,59
0,32	0,60	8,16
0,34	0,72	8,66
0,36	0,84	9,07
0,38	0,96	9,30
0,40	1,08	9,52
0,42	1,20	9,69

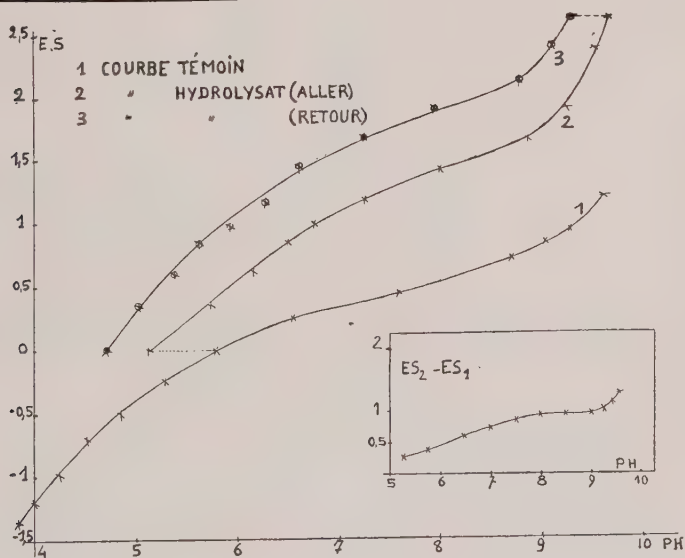


FIG. 2.

Ici également, l'origine des ordonnées, pour les équivalents soude, a été choisie à 5,78, pH auquel a commencé l'hydrolyse de l'acide ribonucléique.

TABLEAU II bis. — Hydrolysat d'A.R.N.

E. S.	pH (Titration directe)	pH (titration retour)
0	5,42	4,67
0,36	5,72	4,97
0,60	6,19	5,40
0,84	6,50	5,67
0,96	6,67	5,93
1,20	7,30	6,26
1,44	8,00	6,61
1,68	8,86	7,23
1,92	9,24	7,93
2,16	9,38	8,78
2,40	9,57	9,11
2,64	9,72	9,37

Si nous comparons la courbe de titration directe de l'hydrolysat « 2 » avec la courbe de titration de la solution témoin « 1 », nous constatons :

Une première divergence des courbes de pH 5 à pH 8, correspondant à 0,90 E. S., à pH 8 ;

Une deuxième divergence à partir de pH 9. A pH 9,67, l'écart entre les deux courbes correspond à 1,32 E. S.

A pH 9,72, nous avons laissé l'hydrolysat enzymatique séjourner trente minutes à 20° sous azote. Après ce laps de temps, le pH était tombé à 9,37. Nous avons alors titré en retour par de l'acide chlorhydrique N/12,5. La courbe obtenue, « 3 », présente dans tout son trajet un important décalage vers des pH inférieurs par rapport à la courbe de titration directe de l'hydrolysat « 2 ». Ce décalage, aux environs de pH 8, correspond à 0,5 E. S.

Nous pouvons interpréter ces faits de la façon suivante :

1° A l'examen des courbes « 1 » et « 2 », nous constatons, comme dans l'expérience précédente, l'existence de deux dissociations :

De pH 6 à pH 8 se trouvent libérées des fonctions acides phosphoriques secondaires ;

A partir de pH 9, des fonctions énols font leur apparition.

2° Le déplacement de la courbe « 3 » par rapport à la courbe « 2 » peut se concevoir comme le résultat de l'apparition de groupes acides phosphoriques.

On peut penser que des groupes acides phosphoriques libérés entrent dans une liaison particulièrement sensible aux alcalis, assez analogue aux liaisons pyrophosphoriques alcali-labiles des ferments de Warburg et de von Euler.

Des liaisons pyrophosphoriques peuvent donc se concevoir en tant que liaisons internucléotidiques de l'acide ribonucléique.

En résumé, les liaisons dans lesquelles peuvent entrer les groupes acide phosphorique de l'acide ribonucléique sont de nombreux types. La liaison ester en position 2 ou 3 du ribose, liaison classique des schémas de Levene, semble la liaison principale. Mais Gulland a suggéré la possibilité de nucléotides intermédiaires possédant une liaison en 5 ; un équilibre se ferait entre les deux formes $P - C_2 \rightleftharpoons P - C_5$.

Parmi les autres liaisons susceptibles d'exister, nous avons envisagé les liaisons : phosphates d'amine, phosphates d'énol, pyrophosphates.

Ces liaisons possèdent un intérêt du point de vue énergétique. En effet, il est possible, d'après les travaux de Lippman, de considérer les liaisons ester $P - OH$ comme des liaisons de faible énergie ; les liaisons phosphates d'amine $P \sim NH_2$, phosphates d'énol $P \sim OH$, pyrophosphates $P \sim O \sim P$, comme des liaisons de haute énergie. Ainsi, l'acide ribonucléique représenterait dans la cellule un réservoir énergétique idéal pouvant, grâce à des libérations d'énergie, intervenir dans des réactions de synthèses diverses.

Par ailleurs, le mode d'arrangement des diverses liaisons internucléotidiques peut présenter une importance primordiale. Leur répétition suivant une période bien déterminée limite peut-être des motifs caractéristiques. Astbury a mis en évidence, grâce aux rayons X, une période de 16 nucléotides dans l'acide désoxyribonucléique. Il est possible qu'une alternance d'un type analogue existe dans certains acides ribonucléiques. Ces acides nucléiques serviraient de modèles à certaines protéines de structure périodique. Mais des travaux récents imposent des considérations nouvelles. Sanger [2] vient en effet de mettre en évidence, dans l'insuline, un enchaînement d'acides aminés sans régularité ni périodicité. On peut cependant noter dans la partie centrale de la chaîne de la fraction B une prédominance des acides monoaminés-monocarboxyliques aliphatiques. Ne pourrait-on pas établir une comparaison entre cette disposition et celle des nucléotides dans l'acide ribonucléique ? Nous savons, en effet, que la ribonucléase découvre au sein de la molécule nucléique un noyau de nucléotides riches en bases puriques, sur lequel viendraient se disposer des chaînons plus riches en bases pyrimidiques.

La multiplicité des types de liaisons, l'ordre d'enchaînement des nucléotides sont peut-être en rapport avec la spécificité si étroite des acides nucléiques. Gulland [3, 4] a très justement insisté sur la notion d'isomérisation ; souvent des considérations analytiques classent, comme identiques, des acides nucléiques ; mais de simples modifications dans la séquence de leurs nucléo-

tides permettraient d'expliquer des différences dans leur comportement biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. VIGNAIS. *Ces Annales*, 1953, **85**, 64 et thèse Doctorat ès sciences, Paris, juin 1952.
- [2] F. SANGER. Symposia on quantitative biology, Cold Spring Harb. Symp. 1949.
- [3] J. M. GULLAND. *Chemistry and Industry*, 1940, **59**, 321.
- [4] J. M. GULLAND. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1947, **12**, 95.

POUVOIR PROTECTEUR ANTI-TYPHOÏDIQUE DE SÉRUMS HUMAINS. ÉTUDE SUR L'EMBRYON DE POULET

par M^{me} J. GRABAR et M^{me} S. LE MINOR.

(*Institut Pasteur.*)

Dans un article précédent [1], nous avons décrit la technique que nous utilisons dans l'épreuve de séro-protection sur l'embryon de poulet. Nous avons employé dans ce premier travail des sérums de lapins hyperimmunisés afin de voir si cette technique était applicable à l'évaluation de leur pouvoir protecteur. Les résultats obtenus nous ont encouragées à entreprendre l'étude de sérums humains de sujets « normaux », malades, anciens malades, porteurs de germes, et surtout vaccinés. Ce sont les résultats de ces examens qui feront l'objet de cette étude.

MATÉRIEL. — SÉRUM HUMAIN. — Le sang est prélevé à jeun, stérilement et le sérum décanté est conservé à la température + 4°. Avant chaque épreuve, la stérilité du sérum est contrôlée. Lorsque le sérum était accidentellement contaminé, nous avons essayé de le filtrer sur bougie (L 3), mais les épreuves comparatives faites sur l'œuf avec des sérums filtrés et non-filtrés nous ont montré que la filtration sur bougie « inactivait » le sérum. On sait, en effet, que le complément ou, au moins l'un de ses constituants, est adsorbé sur la bougie. Mais, comme nous le verrons plus loin, le complément a un rôle peu important, sinon nul, dans l'épreuve de séro-protection sur l'embryon de poulet. Il nous faudrait admettre que les anticorps protecteurs sont aussi adsorbés par la filtration sur bougie.

Nous avons essayé alors la filtration sur des membranes stérilisantes à porosité de diamètre moyen des pores 2R-800 m μ (1). Les épreuves comparatives nous ont montré que cette méthode était utilisable : le sérum filtré est stérile, et son activité protec-

(1) Nous remercions M. Pierre Grabar qui a bien voulu se charger de cette filtration.

trice n'est nullement diminuée. Le titre du complément baisse, cependant considérablement.

Avec un même sérum, nous avons effectué plusieurs examens successifs à une semaine d'intervalle afin de nous rendre compte de l'influence du temps de conservation du sérum dans l'épreuve. Les résultats sont stables du troisième jour au quinzième jour. Puis le pouvoir protecteur fléchit jusqu'à devenir nul au bout d'un mois. Le titre du complément, apprécié par réaction d'hémolyse (titrage Kolmer), a baissé considérablement au bout de quinze jours. Dans certains sérums, on ne pouvait plus titrer le complément ; dans d'autres, une baisse au tiers du titre initial a été constatée et, néanmoins, la séro-protection nous a donné à peu de différence près, le même résultat. D'ailleurs, le fait d'avoir ajouté du complément frais de cobaye, en quantité correspondant au titre du sérum frais, à des sérums vieillies, n'a pas changé les résultats. De même, aucun changement ne se produit si, au sérum inactivé (une demi-heure à 56°) on ajoute du complément frais de cobaye. Le chauffage à 56° inhibe le pouvoir protecteur d'un sérum, sans agir sur le pouvoir agglutinant qui reste le même.

Ainsi, le délai que nous avons adopté pour l'utilisation d'un sérum pour une épreuve de séro-protection, est de quinze jours, à condition de garder le sérum au réfrigérateur.

Pour chaque sérum nous avons titré les agglutinines O, H et Vi.

SOUCHE INFECTANTE. — La souche avec laquelle nous avons travaillé est *S. typhi* 556 (V) de notre collection, qui nous donne depuis trois ans des résultats constants pour l'évaluation de la mortalité, 50 p. 100 chez les témoins.

OEufs. — Les œufs proviennent de poules de la race Rhode Island, comme dans notre travail précédent.

TECHNIQUE. — Nous avons suivi la technique antérieurement décrite. Le sérum dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique est mélangé à un volume égal de suspensions microbiennes allant de 200 germes au millilitre à 20 000 germes au millilitre. Les témoins reçoivent uniquement les suspensions de 20 germes et de 200 germes au millilitre additionnées d'un volume égal d'eau physiologique. Nous inoculons sur la membrane chorio-allantoïde de l'œuf 0,2 ml du mélange à volume égal (sérum dilué au 1/10 et suspension titrée). Comme la mortalité 50 p. 100 des témoins correspond toujours à une dose inférieure à 20 germes inoculés, les sérums qui protègent au-dessus de cette dose peuvent déjà être considérés comme ayant un certain pouvoir protecteur. Mais pour éliminer le pouvoir bactéricide non spécifique éventuel du

sérum, c'est uniquement pour des protections supérieures à 50 germes inoculés que nous considérons qu'un sérum protège.

Nous apprécions le taux de mortalité 50 p. 100 par la méthode de Reed et Muench en utilisant le papier graphique semi-logarithmique. Les chiffres que nous rapporterons correspondent au nombre de germes inoculés.

Nous avons observé que les chiffres obtenus pour un même individu, lors des examens répétés ne sont pas exactement les mêmes, le moment du prélèvement du sang ayant certainement une influence sur le pouvoir protecteur du sérum (état physiologique de l'individu). En général ces variations sont minimales surtout avec les sérums d'hommes. Les sérums de femmes montrent des variations beaucoup plus importantes, sur lesquelles nous reviendrons plus loin.

POUVOIR PROTECTEUR DE SÉRUMS « NORMAUX ». — Nous considérons comme « normaux » les sérums qui proviennent de personnes n'ayant jamais été vaccinées ou n'ayant jamais eu la fièvre typhoïde. Il est assez difficile actuellement de se procurer de tels sérums, en raison de la grande expansion de la vaccination anti-typho-paratyphoïdique. De plus, nous avons recherché des sérums de personnes ne dépassant pas 40 ans, les statistiques épidémiologiques de la fièvre typhoïde montrant qu'à partir de cet âge, le nombre de sujets susceptibles d'être atteints diminue considérablement [2].

Nous avons expérimenté sur 10 sérums répondant à ces conditions. La recherche des agglutinines O, H et Vi est restée négative, même à la dilution de 1/10. Sur ces 10 sérums, 6 n'ont montré aucune protection de l'embryon de poulet contre 20 germes injectés, tandis que 4 nous ont donné des chiffres dépassant 50 germes inoculés et une fois même 2 000 germes (voir le tableau). Autrement dit, sur les 10 sérums il y a eu 40 p. 100 de protection « naturelle ». Etant donné le petit nombre des sérums, ce résultat n'a pas de valeur statistique, mais il peut expliquer que lors d'une épidémie de fièvre typhoïde un grand nombre de sujets non vaccinés ne contracte pas la maladie [2].

SÉRUMS D'ANCIENS MALADES ET DE PORTEURS DE GERMES. — La fièvre typhoïde, comme on le sait, confère une immunité stable et durable. Les 10 sérums d'anciens malades sur lesquels nous avons expérimenté, nous ont donné en moyenne la dose du taux 50 p. 100 à 200 germes inoculés (voir tableau). Nous avons pu examiner le sérum d'un malade au dixième jour de la maladie, avant le traitement par les antibiotiques. A cette date, son sérum protégeait contre 100 germes. Lors de sa sortie de l'hôpital, la dose 50 p. 100 de protection était de 997 germes

inoculés. Un an plus tard, cette dose a été évaluée à 2 000 germes.

Un cas intéressant nous paraît être celui d'une ancienne malade (ser. M., fièvre typhoïde en 1946) dont le sérum examiné à trois reprises n'a révélé aucune protection, la dose de 50 p. 100 étant une fois 36 germes, une fois 40 germes et une fois inférieure à 20 germes. Son sérum agglutinait à chaque examen : EO-1/100 ; EH-1/200 et Vi-1/20-1/40 (2). Par la méthode de l'hémagglutination, le titre des agglutinines Vi était également à 1/40. Un interrogatoire plus serré de la personne nous a appris qu'à deux reprises, le sang avait été prélevé la veille de ses règles (la personne ne se rappelait pas son état physiologique lors du premier prélèvement). Un nouvel examen effectué sur son sérum dix jours après la fin des règles, a montré une protection contre 250 germes.

Nous avons pu constater le même changement du pouvoir protecteur au cours du cycle menstruel pour deux autres sérums de femmes vaccinées. Les témoins-sérums, c'est-à-dire les œufs inoculés uniquement avec 0,1 ml de sérum dilué à 1/10, ont survécu dans les trois cas. Ce fait parlerait en faveur d'une baisse du pouvoir protecteur du sérum et non d'une action toxique de celui-ci à certaines périodes du cycle ovarien. Notons que le titre des agglutinines est resté le même dans les trois cas, que le prélèvement ait été effectué au moment où le pouvoir protecteur était le plus élevé ou à celui où il était fortement abaissé.

Nous avons dit, au début de ce travail, que la filtration sur bougie enlevait tout pouvoir protecteur aux sérums de vaccinés. Par contre, parmi les sérums de malades, nous avons eu deux sérums (ser. N. et sér. S.) d'anciens vaccinés qui, après filtration sur bougie, continuaient à protéger, l'un contre 275 germes, l'autre contre 100 germes.

Les sérums de sujets porteurs de germes que nous avons examinés, ne nous fournissent aucune indication quant au pouvoir protecteur de cette catégorie. Nous avons expérimenté trois sérums de porteurs de germes, provenant de personnes internées dans un asile. Les trois sérums agglutinaient les suspensions Vi aux titres de 1/20-1/40. Les mêmes titres ont été obtenus par la technique d'hémagglutination. Les trois sérums nous sont parvenus contaminés et, malgré la filtration sur bougie, deux ont protégé contre 200 germes, le troisième contre 50 germes.

Bien que le pouvoir protecteur de ces trois sérums après filtration soit satisfaisant, nous ne pouvons apporter de conclusion

(2) Malgré plusieurs coprocultures, nous n'avons jamais pu isoler *S. typhi*, pour expliquer la persistance des agglutinines Vi à un tel titre. Par contre, les agglutinines O et H chez cette ancienne malade, peuvent s'expliquer par une vaccination DT.TAB, effectuée après sa maladie.

valable en raison du petit nombre de cas. Mais, il nous semble qu'un rapprochement peut être fait entre des résultats obtenus avec ces sérums de porteurs de germes et ceux d'anciens malades (ser. N. et S.) : dans les deux cas la filtration sur bougie n'a pas enlevé le pouvoir protecteur. Il n'est pas, à notre connaissance, de statistique établie sur les cas de typhoïde chez les porteurs de germes, mais ces derniers devraient être aussi bien protégés contre une infection que le sont les anciens malades.

POUVOIR PROTECTEUR DES SÉRUMS DE VACCINÉS. — Le plus grand nombre de sérums examinés provient de sujets vaccinés. Sauf un cas, vacciné dans l'armée en 1946 en Angleterre, probablement avec de l'« alcool-vaccin » (la personne n'a pas pu nous fournir de renseignements à ce sujet), tous les sujets ont été vaccinés à différentes périodes par les vaccins TAB ou DT.TAB de l'Institut Pasteur. Nous avons expérimenté sur 50 sérums, dont quelques-uns proviennent des mêmes sujets, mais dont les prélèvements furent faits à diverses reprises durant trois ans. Notons, tout de suite, que tous les sujets avaient normalement été vaccinés, c'est-à-dire par trois injections, et la majorité d'entre eux avaient eu un an après une injection de rappel. De plus, les vaccinations étaient, sauf pour deux cas, relativement récentes (entre trois et cinq ans).

Aucun des sérums de vaccinés n'avait d'agglutinines Vi même au titre de 1/10. Par contre, tous avaient des agglutinines H à un titre égal ou supérieur au 1/200, certains des agglutinines O, celles-ci dépassant rarement 1/50.

L'épreuve faite sur l'œuf avec 50 sérums de vaccinés (la dose témoin 50 p. 100 étant de 2 germes inoculés), ne nous a jamais donné une protection inférieure à 50 germes (50 p. 100). Les chiffres sont compris entre 50 et 500 germes, la majorité des sérums ayant protégé contre 100 à 500 germes (voir tableau).

Nous avons parlé de la variation du pouvoir protecteur des sérums des femmes, anciennes malades ou vaccinées. Chez l'homme ces variations sont minimes. Ainsi, le sérum L, a protégé au premier examen contre 400 germes ; refait trois mois plus tard, il protégeait contre 350 germes, un an après 480 germes et, quinze mois plus tard, 400 germes.

Les résultats obtenus avec les sérums des vaccinés sont comparables à ceux fournis par les sérums d'anciens malades. La vaccination provoque donc comme la fièvre typhoïde l'apparition d'anticorps protecteurs décelables dans le sérum. Mais les différences de résultats de la séro-protection, des sérums de malades et de ceux des vaccinés après filtration sur bougie, pose la question de l'identité de la nature de ces anticorps.

Tableau d'ensemble des résultats.

CATÉGORIES DES SÉRUMS EXAMINÉS	PROTECTION 50 p. 100 évaluée en nombre de germes inoculés				TOTAL
	50	50-200	200-500	500-2 000	
Normaux	6	2	1	1	10
Malades et anciens malades			8	2	10
Porteurs de germes sérums filtrés		1	2		3
Vaccinés		13	32	5	50

DISCUSSION. — Jusqu'ici, l'épreuve de séro-protection anti-typhoïdique avec des sérums humains a toujours été faite sur des souris [3, 4, 5, 6]. Nous l'avons pratiquée nous-mêmes et nous continuons à la pratiquer comparativement à l'épreuve sur l'embryon, dans l'évaluation du pouvoir vaccinant d'un vaccin anti-typho-paratyphoïdique.

L'épreuve sur l'embryon de poulet a certains avantages sur l'épreuve sur la souris, tout en donnant des résultats aussi précis. Il est d'abord relativement simple de se procurer des œufs de même race tandis que pour les souris ce problème est plus difficilement résolu. Il suffit d'avoir une étuve pour obtenir le développement de l'embryon. L'influence de la température ambiante, de la nourriture, l'incidence éventuelle des épidémies dans les élevages, diminuent de beaucoup la commodité du travail avec les souris et rendent souvent l'interprétation des résultats difficile.

De plus, on sait que la souris est réfractaire à l'infection typhoïdique et l'injection intrapéritonéale est un moyen bien artificiel de provoquer la mort chez cet animal. L'embryon de poulet est sensible à *S. typhi*, et un nombre de germes minime, relativement stable pour une même souche, suffit à le tuer. Comme nous l'avons dit dans notre premier travail, l'épreuve est un test de *virulence* et non de *toxicité*. Rappelons encore une fois que les œufs embryonnés qui survivent, même inoculés avec des doses élevées, ont un aspect normal et il n'y a pas de multiplication des germes, comme c'est le cas des œufs dont les embryons meurent.

Enfin, l'évaluation du résultat par la dose 50 p. 100 nous paraît être très importante. On connaît, en effet, d'après les derniers travaux sur les salmonelloses expérimentales [7, 8, 9], combien ce nombre varie d'après le germe infectant et l'individu. Le fait que, dans l'épreuve sur l'embryon, les témoins sont tués avec le même nombre de germes et que nous effectuons l'épreuve avec le sérum en utilisant des nombres supérieurs à ceux des témoins,

nous permet de conclure que toute survie de l'embryon est fonction du pouvoir protecteur du sérum.

Ce pouvoir protecteur est-il spécifique ? Dans notre premier travail, nous avons pu démontrer la spécificité de l'épreuve, les 10 sérums des lapins neufs ne nous ayant donné aucune protection. Dans le cas des sérums humains, l'épreuve faite sur des sérums dits normaux n'est pas concluante. D'ailleurs les sérums normaux, éprouvés sur la souris par Siler et coll., ont protégé la souris dans 52 p. 100 de cas.

Quel est le rôle du complément dans l'épreuve ? D'après nos expériences il semble négligeable. Du sérum frais de cobaye ajouté à des sérums qui ne possédaient plus de complément, dont le pouvoir protecteur avait fléchi, n'a jamais réactivé ce pouvoir. Comme nous nous sommes méfiées de sérums « normaux » humains, nous n'avons jamais fait d'épreuves en ajoutant du complément humain. De plus, la protection obtenue avec les sérums d'anciens malades, filtrés sur bougie (donc sans complément) nous semble être une preuve de plus de la non-intervention du complément, le sérum étant toujours dilué dans l'épreuve à 1/10.

Les anticorps protecteurs du sérum sont indépendants des agglutinines. Ces dernières n'ont jamais pu être mises en évidence, même à des titres bas, dans les sérums « normaux » ; pourtant certains d'entre eux ont eu un pouvoir protecteur élevé. Il est possible que nous soyons en présence des agglutinines incomplètes, non décelables par les méthodes d'agglutination courantes ou par l'hémagglutination, mais il est possible que ces anticorps soient d'une nature tout autre et que leur mise en évidence *in vitro* demande d'autres moyens d'investigation.

Quelle est la valeur des résultats régulièrement positifs que nous avons obtenus avec les sérums des vaccinés ? Il est vraisemblable que, parmi les sérums éprouvés, plusieurs personnes étaient naturellement immunisées. Mais les bons résultats sont aussi dus en grande partie à la vaccination correcte des sujets dont nous avons examiné les sérums. Néanmoins, tant que nous n'aurons pas de précisions sur le nombre de germes nécessaires pour provoquer l'apparition de la fièvre typhoïde, nous ne pourrions pas affirmer que les chiffres obtenus sur l'embryon de poulet ont une signification absolue.

Mais il nous semble, que l'intérêt principal de l'épreuve de sérums humains sur l'embryon de poulet consiste, nous le répétons, dans l'évaluation du pouvoir antivirulence de ces sérums. Cette méthode diffère donc de la séro-protection effectuée sur souris qui permet, elle, d'apprécier le pouvoir antitoxique d'un sérum antityphoïdique. Mais ces deux méthodes n'évaluent que les anticorps sériques qui ne représentent qu'une partie de

l'immunité antityphoïdique, qu'elle soit naturelle ou acquise par la maladie ou la vaccination.

RÉSUMÉ. — Les résultats des épreuves faites sur l'embryon de poulet avec des sérums humains de personnes « saines », anciens malades et surtout vaccinées sont donnés. Les avantages de l'épreuve sur embryon de poulet comparée à celle sur souris sont discutés. Plusieurs questions sont soulevées, entre autres celle de la nature des anticorps protecteurs, qui demandent des recherches ultérieures.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. GRABAR et S. LE MINOR. *Ces Annales*, 1951, **81**, 528.
- [2] M. RAETIG. *Typhusimmunität und Schutzimpfung*. Ed. Gustav Fischer Jena, 1952.
- [3] M. C. SILER et coll. *Immunization to typhoid Fever*. The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1941.
- [4] H. C. BATSON, M. LANDY et M. BROWN. *J. Exp. Med.*, 1950, **91**, 219.
- [5] A. BONNEFOI et J. GRABAR. *Ces Annales*, 1947, **73**, 259.
- [6] A. JUDE et A. MASSE. *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 20.
- [7] L. HORMAECHÉ, A. PELUFFO et P. L. ALEPPO. *Arch. Chirurg. med.*, 1936, **9**, 113, cité d'après KIRBY, HALL et COAXLEY. *Lancet*, 1950.
- [8] N. B. MC CULLOUGH. *Publ. Health Rep.*, 1951, **66**, 1538.
- [9] N. B. MC CULLOUGH et C. W. EISEBE. *J. inf. Dis.*, 1951, **89**, 209 et 259.

MÉTHODE PRATIQUE DE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DU PHOSPHORE. APPLICATION AU DOSAGE DU PHOSPHORE DANS LES TERRES

par J. KAUFFMANN (*).

*(Office de la Recherche Scientifique Outre-Mer,
Laboratoire de Microbiologie du Sol.)*

Cette méthode est basée sur la propriété que possède une bactérie de réduire les nitrates en nitrites.

Une étude de la fonction réductrice de cette bactérie, que nous avons dénommée souche E, a déjà fait l'objet d'un travail antérieur [1]. Ce qui caractérise essentiellement cette souche, c'est de conserver le pouvoir de réduire les nitrates en nitrites dans tous les milieux de culture permettant sa croissance.

Nous avons en effet remarqué que cette réduction est indépendante du rapport $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ du milieu de culture. Elle se produit dans les milieux synthétiques comme dans les milieux organiques les plus complexes : milieu au bouillon, à l'eau peptonée, à l'extrait de viande et de foie.

Cette même souche possède, en plus, la propriété de réduire la totalité des nitrates en nitrites dans les milieux de culture qui contiennent, outre l'azote nitrique, de l'azote ammoniacal ou aminé.

Cette seconde propriété nous a permis de mettre au point un dosage microbiologique des nitrates dans les milieux les plus complexes contenant de l'azote nitreux, ammoniacal et aminé [2]. En outre cette bactérie possède les caractères suivants :

Bâtonnet présentant des granulations internes se colorant facilement par le violet de gentiane ; présente des formes irrégulières en massue ; germe asporulé, Gram positif, non acido-résistant, immobile ; les colonies sur gélose sont rugueuses, petites (environ 1 mm de diamètre), de couleur orange caractéristique ; ne coagule pas le lait mais celui-ci se trouve fortement alcalinisé.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 mai 1953.

Ce germe utilise le glucose, le saccharose, le benzoate, l'oxalate, le pyruvate, le citrate et le propionate comme source carbonée (ces dernières substances carbonées étant sous forme de sels de sodium). Cette bactérie est incapable d'utiliser le butyrate et le tartrate de sodium.

Etant donné ses caractères, nous avons été amené à nommer définitivement cette nouvelle souche bactérienne : *Corynebacterium aurantiacum*.

Ces premières données étant connues, nous avons poursuivi nos recherches sur le mécanisme de la réduction des nitrates en nitrites par cette souche en étudiant l'influence du phosphore sur cette réduction. C'est cette nouvelle recherche qui nous a permis de réaliser un dosage microbiologique du phosphore.

I. — INFLUENCE DU PHOSPHORE SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES EN NITRITES.

Pour cette étude nous avons fait l'expérience suivante :
Le milieu de culture suivant :

Sulfate de potassium	0,2 g
Sulfate de magnésium	0,1 g
Chlorure de sodium	0,1 g
Sulfate ferrique	0,002 g
Sulfate de manganèse	0,002 g
Nitrate d'ammonium	3 g
Carbonate de calcium	3 g
Eau distillée.	1 000 cm ³

a été réparti dans des tubes à essais de 15 mm de diamètre a raison de 4 cm³ par tube. Dans chaque tube a été ajoutée une quantité bien définie de phosphore, de manière à obtenir une gamme de concentration allant de 0 à 2 µg de phosphore par 0,2 µg. On complète le volume du milieu de chaque tube à 5 cm³ avec de l'eau distillée. Les tubes ont été ensuite bouchés au coton et stérilisés à l'autoclave (vingt minutes à 115°). Après six jours de culture à l'étuve à 29°, on prélève II à III gouttes des différents milieux de culture et on note, sur ces prélèvements, l'apparition des nitrites avec le réactif de Griess. Une deuxième caractérisation, faite vingt-cinq jours après l'ensemencement, a donné les mêmes résultats. Ceux-ci sont résumés dans le tableau I. Son examen montre que les nitrites n'apparaissent uniquement que dans les milieux de culture contenant au moins 1,4 µg de phosphore, soit 0,28 µg de phosphore par centimètre cube de milieu.

Cette quantité minimum de phosphore nécessaire à la réduction des nitrates en nitrites, que nous pouvons appeler seuil de dénitrification, dépendra évidemment de la pureté des produits uti-

TABLEAU I.

Phosphore en μg ajouté dans 5 cm^3 de milieu	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2
Caractérisation des nitrites .	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+

Caractérisation des nitrites; 0, négatif au réactif de Griess; +, positif au réactif de Griess.

lisés pour composer le milieu de culture. Pour nos expériences nous avons utilisé les produits R. P. Prolabo.

Nous avons recherché ensuite si l'âge de la souche ou la richesse d'ensemencement du milieu de culture avait une action sur ce seuil de dénitrification. Pour ce faire nous avons réalisé l'expérience suivante :

Nous avons utilisé comme précédemment le milieu de culture réparti dans des tubes à essais. Nous avons réalisé les ensemencements suivants :

- 1° Ensemencement pauvre avec une souche âgée de trois jours.
- 2° Ensemencement riche avec une souche âgée de trois jours.
- 3° Ensemencement pauvre avec une souche âgée de cinquante jours.

- 4° Ensemencement riche avec une souche âgée de cinquante jours.

La stérilisation a été faite à l'autoclave, vingt minutes à 115° . Nous avons caractérisé les nitrites six jours après l'ensemencement. Dans ces conditions on constate que la quantité nécessaire et suffisante de phosphore pour provoquer l'accumulation de nitrites dans les différents milieux de culture est égale à celle trouvée précédemment c'est-à-dire $0,28 \mu\text{g}$ de phosphore par centimètre cube de milieu de culture. Les résultats trouvés ont été identiques pour tous les différents ensemencements réalisés. L'âge de la souche bactérienne et la richesse d'ensemencement du milieu de culture n'ont donc aucune action sur le seuil de dénitrification.

Nous avons enfin fait une dernière expérience, en tubes à essais, en faisant varier le temps de stérilisation du milieu de culture : vingt et quatre-vingt-dix minutes à l'autoclave à 115° . Le seuil de dénitrification s'est montré identique dans les deux lots et égal à $0,28 \mu\text{g}$ de phosphore par centimètre cube de milieu. Le temps de stérilisation, dans les conditions d'expérience, n'a donc aucune action sur le seuil de dénitrification.

L'ensemble des expériences décrites ci-dessus montre que la réduction des nitrates en nitrites par le *Corynebacterium aurantiacum* exige, dans des conditions d'expériences données, la pré-

sence d'une quantité minima, bien définie, de phosphore dans le milieu de culture.

Cette propriété nous a amené à réaliser un dosage microbiologique du phosphore. Nous avons appliqué cette nouvelle méthode au dosage du phosphore dans la terre.

II. — DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DU PHOSPHORE DANS UNE TERRE.

A. PRINCIPE. — La technique que nous utilisons consiste à ajouter différentes quantités d'une même terre, préalablement séchée sur chlorure de calcium et broyée, dans des tubes à essais contenant chacun 5 cm³ de milieu de culture sans phosphore. Ces tubes sont bouchés au coton, stérilisés puis ensemencés avec le *C. a.* Après dix jours de culture à l'étuve à 29°, on prélève, dans chaque tube, quelques gouttes de milieu de culture sur lesquelles on caractérise l'apparition des nitrites.

Parmi ceux révélant une production de nitrites, celui contenant la plus petite quantité de terre ayant permis cette production, est celui où la quantité de terre mise dans le tube contient la quantité de phosphore correspondant au seuil de dénitrification.

Cette quantité de terre étant connue ; la quantité de phosphore correspondant au seuil de dénitrification étant elle aussi connue, il est facile de déterminer le contenu en phosphore assimilable de la terre étudiée.

B. ETUDE COMPARATIVE SUR DIFFÉRENTES TERRES. — Cette technique étant établie, nous avons effectué le dosage microbiologique du phosphore sur les échantillons de terre suivants :

1° Terre de la région de basse Côte d'Ivoire.

a) Terre sous forêt (Terre I).

b) Terre initialement sous forêt mais défrichée et maintenue dénudée depuis trois ans (Terre III).

c) Terre initialement sous forêt que l'on a défrichée puis abandonnée à la végétation depuis trois ans (Terre II).

2° Terre de culture de la région du Haut Dahomey (Terre IV).

3° Terre de culture de la région de Toulouse [France] (Terre V).

Les temps de stérilisation ont été de vingt, quarante-cinq et quatre-vingt-dix minutes à 115°. La caractérisation des nitrites faite soit huit jours, soit vingt et un jours après l'ensemencement a donné des résultats identiques. Ceux-ci sont résumés dans le tableau II. Un fait apparaît immédiatement : l'augmentation du temps de stérilisation affecte le seuil de dénitrification de certaines terres seulement : il la diminue.

L'explication de l'abaissement du seuil doit certainement être cherchée dans le fait que l'hydrolyse des composés phosphorés

TABLEAU II.

Quantité de terre en mg ajoutée dans 5 cm ³ de milieu	TERRE I			TERRE II			TERRE III			TERRE IV			TERRE V		
	Temps de stérilisation			Temps de stérilisation			Temps de stérilisation			Temps de stérilisation			Temps de stérilisation		
	20 min	45 min	90 min	20 min	45 min	90 min	20 min	45 min	90 min	20 min	45 min	90 min	20 min	45 min	90 min
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+
30	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+
50	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+
150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+
200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Caractérisation des nitrites par le réactif de Griess : 0, réaction négative; +, réaction légèrement positive (coloration rose); ++, réaction positive (coloration rouge); +++, réaction très positive (le réactif précipite).

non assimilables par la bactérie est d'autant plus poussée, avec libération de phosphore sous forme assimilable par la bactérie, que le temps de stérilisation est plus long.

Une même quantité de terre pourra donc contenir d'autant plus de phosphore assimilable que le temps pendant lequel elle est stérilisée sera long.

Nous avons recherché quel serait le seuil de dénitrification de certaines de ces terres en stérilisant celles-ci à sec. Dans ce but nous avons fait l'expérience suivante.

La terre répartie dans des tubes à essais a été stérilisée à sec à l'étuve à 180° pendant une heure. On ajoute alors dans chaque tube 5 cm³ de milieu de culture préalablement stérilisé à l'autoclave pendant vingt minutes à 115°. Dans ces conditions le seuil de dénitrification a été réalisé avec 100 mg de terre de la région de Toulouse et avec 150 mg de terre provenant de la région du Haut Dahomey. Cette expérience n'a pas été faite sur les autres échantillons de terre.

On remarque que le seuil de dénitrification peut être différent suivant que la terre a été stérilisée à l'autoclave ou à l'étuve en atmosphère sèche.

Il est évident que le phosphore libéré par une stérilisation donnée sera essentiellement fonction de la nature de la terre. Ce qui est important, c'est d'opérer toujours dans les mêmes conditions expérimentales afin de pouvoir comparer, quant à leur teneur en phosphore, différentes terres entre elles.

La stérilisation à l'autoclave présente deux avantages sur la stérilisation à l'étuve, à savoir :

1° La méthode est plus pratique. Elle évite de stériliser à part la terre et le milieu de culture.

2° Elle permet de connaître la quantité de phosphore libéré par hydrolyse : hydrolyse provoquée par différents temps de stérilisation, ce qui permet de connaître approximativement le rapport entre la quantité de phosphore assimilable sinon par la plante, du moins par la bactérie, et la quantité de phosphore rendu assimilable par stérilisation.

III. — COMPARAISON ENTRE LA TENEUR DE PHOSPHORE TROUVÉ DANS QUELQUES TERRES PAR LES MÉTHODES MICROBIOLOGIQUE ET CHIMIQUE (1).

Ces dosages ont été effectués sur les 5 échantillons de terre ayant déjà servi pour nos expériences ci-dessus. Les différents teneurs en P_2O_5 de ces terres trouvés par les deux méthodes, chimique et microbiologique, sont résumées dans le tableau suivant :

TABLEAU III.

N° des échantillons de terre	Méthode microbiologique			$\frac{P_2O_5}{P_2O_5}$ $\frac{90\text{ min}}{20\text{ min}}$	Méthode chimique	
	P ₂ O ₅ en %				P ₂ O ₅ en % assimilable (méthode à l'acide citrique)	P ₂ O ₅ en % total
	trouve par une stérilisation de :					
	20 min	45 min	90 min			
I	0,010	0,010	0,010	I	0,026	0,085
II	0,0064	0,0064	0,0064	I	0,031	0,060
III	0,0032	0,0032	0,0032	I	0,013	0,055
IV	0,002	0,0032	> 0,032	> 16	0,00063	0,048
V	0,0016	0,0064	> 0,032	> 20		0,154

Par suite d'une quantité de terre insuffisante, le dosage du P_2O_5 assimilable, par la méthode chimique, n'a pu être fait sur la terre V. A noter que la précision du dosage microbiologique que nous avons effectué sur ces échantillons de terre a été de 20 p. 100.

L'examen de ce tableau montre que les résultats trouvés par la méthode microbiologique sont souvent peu comparables à ceux trouvés par la méthode chimique.

Ce ne sont que des dosages comparatifs entre la méthode chimique et microbiologique, effectués sur de nombreuses terres de nature très différente qui permettront de connaître quelle est, de ces deux méthodes, celle qui renseigne le mieux sur la richesse réelle d'un sol en phosphore assimilable par la plante.

(1) Les dosages chimiques ont été faits au laboratoire de pédologie de l'O.R.S.O.M.

CONCLUSION.

Le *Corynebacterium aurantiacum* exige pour réduire les nitrates en nitrites, dans des conditions d'expériences données, une quantité minimum bien définie, de phosphore dans le milieu de culture.

Cette quantité minimum de phosphore, appelée seuil de dénitrification est indépendante de l'âge de la souche et de la richesse d'ensemencement du milieu de culture.

Cette propriété nous a permis de mettre au point un dosage microbiologique du phosphore que nous avons appliqué sur des échantillons de terre de différentes provenances.

Cette méthode se révèle pratique et rapide pour connaître approximativement la teneur d'une terre en phosphore. On pourra, en effet, définir qu'une terre est riche en phosphore assimilable si, dans des conditions d'expérience bien définies, le seuil de dénitrification trouvé correspond à la présence d'une quantité de phosphore jugée agronomiquement suffisante.

Une terre sera jugée pauvre en phosphore assimilable si le seuil de dénitrification trouvé au cours de son étude correspond à une teneur trop faible en phosphore.

Il suffit ainsi de deux tubes à essais pour connaître approximativement la teneur d'une terre en phosphore assimilable. Un dosage précis de phosphore nécessitera un nombre de tubes plus important. Le facteur limitant de la précision du dosage sera la pesée de la terre. En effet, le pourcentage d'erreur sera d'autant plus grand que les pesées s'effectueront sur de petites quantités de terre (cas des terres riches en phosphore). On aura, dans ce cas, intérêt à prendre des récipients de grande capacité (Erlenmeyer de 100 cm³ par exemple) ce qui permettra de faire des pesées sur des quantités de terre plus grandes.

Cette méthode, pratique, semble devoir être retenue tout particulièrement pour déterminer la teneur en phosphore assimilable dans les terres. Toutefois, elle peut être appliquée sur d'autres substances et notamment pour doser le phosphore total dans toute substance organique préalablement minéralisée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. KAUFFMANN. *Thèse Sci. Nat.*, Paris, 1950, série A, 2403. N° 3275.
- [2] J. KAUFFMANN. *Ces Annales*, 1951, 81, 293.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 4 Juin 1953.

Présidence de M. GASTINEL.

NÉCROLOGIE

PIERRE SÉGUIN

(1857-1953)

Silencieusement, modestement, comme il l'a fait en tous les actes de sa vie, Pierre Séguin est mort le 28 avril dernier, sans qu'aucun Pasteurien le sût ni l'accompagnât à sa dernière demeure.

C'est par le hasard d'une conversation de rue que nous l'avons appris. Il aurait d'ailleurs été confus que l'un de nous se dérangeât pour cela et il nous blâmerait aujourd'hui d'évoquer ici sa mémoire : car nul savant ne fut plus volontairement effacé, plus modeste que Pierre Séguin. Il était venu à la bactériologie en 1912, muni d'une forte culture naturaliste, et c'est en botaniste qu'il aborda cette science, on sait avec quel bonheur : l'étiologie de la gangrène gazeuse, les découvertes retentissantes partagées avec Weinberg de *Cl. œdematiens*, de *Cl. histolyticum*, *Cl. aerofœtidum* et *Cl. fallax*, la mise au point du sérum anti-gangréneux, le rendirent justement illustre dans le monde entier, où son livre *La gangrène gazeuse*, entièrement écrit par lui, que s'arrachèrent les bactériologistes fut épuisé en peu de temps. Ce qu'on sait moins, c'est la part immense qu'il prit à ces découvertes mémorables, part qu'il n'essaya même pas de revendiquer ; c'est la rigueur de son esprit lumineux qui fit de lui l'un des plus grands bactériologistes de son époque ; c'est l'influence qu'il eut, presque sans le savoir, sans jamais vouloir en prendre conscience, sur la bactériologie ; c'est la précision acharnée, jusqu'à la minutie, qu'il apporta dans la description des espèces anaérobies, à une époque où on les confondait encore les unes avec les autres et que son exemple, peu à peu imposa.

Après la gangrène gazeuse, P. Séguin aborda le chapitre le plus difficile de la bactériologie : les tréponèmes anaérobies. Avec Kritchewski d'abord, avec R. Vinzent ensuite, il découvrit les milieux

et les techniques qui permirent pour la première fois de les cultiver. Ainsi parvint-il à individualiser des espèces entrevues par Noguchi, par Hoffman, par Castellani et à découvrir, avec R. Vinzent, deux espèces nouvelles *Treponema ambigua* et *Treponema comandoni*.

Hélas, ce savant qu'on eût dû honorer à sa mesure et qui avait largement mérité de se voir confier un service à l'Institut Pasteur, dut, pour gagner sa vie, quitter le laboratoire qu'il partageait sans titre, ni traitement, avec Manouélian. C'est dans un laboratoire industriel qu'il continua ses recherches, sans se décourager, et c'est de cette retraite que partirent les célèbres mémoires qu'il publiait dans nos *Annales*. Professeur de bactériologie à l'Ecole de Chirurgie dentaire et de Stomatologie, il connaissait mieux que quiconque les bactéries pathogènes de la cavité buccale. Ses cours, ses conférences à la Société de Chirurgie dentaire et de Stomatologie, dont il était devenu le Président d'honneur, étaient fort suivis et toujours très appréciés.

Nous conserverons de lui le souvenir ému et reconnaissant d'un Maître averti et d'un ami dévoué, aimable et inlassablement serviable en toutes circonstances.

A.-R. P.

COMMUNICATIONS

ACTION

DE LA CORTISONE SUR L'IMMUNISATION DU LAPIN PAR L'ANATOXINE BOTULIQUE B

par A.-R. PRÉVOT, E. R. BRYGOO et R. SILLIOC.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Le traitement du botulisme humain et animal consiste essentiellement : 1° Dans la neutralisation par la sérothérapie antibotulique de la toxine botulique encore libre. Ceci est réalisé par une dose précoce, massive, unique dans le botulisme moyen, répétée un petit nombre de fois dans le botulisme aigu ; 2° Dans la substitution à l'immunité passive réalisée grâce à la sérothérapie, d'une immunité acquise grâce à l'anatoxithérapie.

Nous avons montré antérieurement [1] que chez le cheval la montée des anticorps au cours de l'hyperimmunisation par l'anatoxine est très lente. Il en est de même chez l'homme [1] et l'on s'en aperçoit à la lenteur de la disparition des symptômes. En effet, les dernières observations de traitement du botulisme humain par l'anatoxithérapie nous ont montré qu'il fallait des injections bi-hebdomadaires pendant plusieurs mois [2]. Il était donc indiqué de rechercher une méthode permettant d'obtenir une montée plus rapide des anticorps, afin de hâter la disparition des paralysies.

Nous nous sommes d'abord adressés à la cortisone, bien que les opinions des divers chercheurs quant à son action sur l'immunisation soient contradictoires, les uns comme Chase, White et Dougherty [3] ayant obtenu une augmentation des anticorps anti-staphylococciques sous l'influence de l'ACTH, les autres, tels que Eisen et coll. [4] n'ayant obtenu aucune augmentation dans l'immunisation anti-pneumococcique, les derniers enfin avec Germuth et Ottinger [5] ayant constaté une diminution de 100 p. 100 de la formation des anticorps anti-ovalbumine sous l'action de la cortisone. C'est dans ce dernier groupe que nous rangerons les résultats de Carrère et Roux [6] qui ont constaté

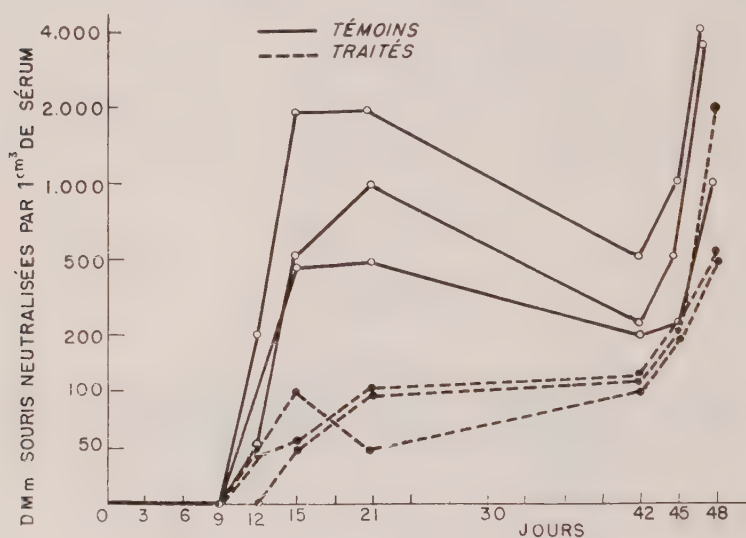


FIG. 1.

une influence défavorable de la cortisone sur la formation des agglutinines anti-*Brucella abortus*.

Nous avons pris le lapin comme animal d'expérience et choisi l'anatoxine botulique B, puisque c'est le type le plus fréquemment rencontré en France dans le botulisme humain. 6 lapins de 2 kg reçurent tous les trois jours une injection sous-cutanée de 2 cm³ d'anatoxine B. La première série comporta 6 injections et après un repos de quatre semaines, les lapins reçurent une injection de rappel de 2 cm³. 3 de ces lapins servirent de témoins. Les 3 autres reçurent pendant trente jours, à partir de la première injection d'anatoxine, une injection intramusculaire quotidienne de 5 mg de cortisone (Cortone Merck). Au cours de cette expérience, les trois témoins augmentèrent régulièrement de poids (200 à 300 g chacun). Au contraire, les traités par la cortisone perdirent en moyenne 200 g chacun et ne reprirent leur poids qu'après la fin du traitement hormonal.

L'antitoxine anti-botulique fut titrée dans le sérum de ces 6 lapins avant chaque injection d'anatoxine ainsi que le vingt et unième jour (six jours après la fin de la première série) et les quarante-cinquième et quarante-huitième jours (trois et six jours après l'injection de rappel). On prélevait chaque fois 1 cm³ de sang qui était immédiatement dilué dans 4 cm³ d'eau physiologique ; après rétraction du coagulum, le liquide décanté était additionné de 1 goutte d'oxyquinoléine à 2,5 p. 100 et constituait la dilution au 1/5 de sérum en vue des neutralisations. La toxine B diluée en eau physiologique peptonée était mise en contact avec les dilutions de sérum pendant une heure à 37° et les mélanges injectés par voie intrapéritonéale à des lots de 3 souris observées pendant quatre jours.

Les résultats de ces titrages sont exprimés par les 6 courbes de la figure 1 (en abscisses, le temps en jours ; en ordonnées les semi-logarithmes du nombre de DMm souris neutralisées par 1 cm³ de sérum). On voit par ces courbes que les 3 témoins présentent une montée à la fois plus rapide et plus haute des anticorps (les nombres allant de 500 à 2 000) suivie de la lente et faible diminution classique pendant la période de repos, puis d'une remontée brusque après l'injection de rappel atteignant des nombres de 1 000 à 4 000. Au contraire, les lapins traités par la cortisone présentent une montée plus lente et moins élevée des anticorps (50 à 100) suivie d'une stagnation en plateau pendant le repos et d'une remontée également plus lente et moins élevée après l'injection de rappel, les nombres terminaux allant de 500 à 2 000. Ces résultats ne permettent pas d'entrevoir un bénéfice de l'usage de la cortisone dans le traitement du botulisme par l'anatoxine. Cette influence défavorable de la cortisone dans l'immunisation antitoxique vient s'ajouter aux résultats susdits et aux nombreux travaux non cités qui ont démontré un effet analogue.

CONCLUSIONS. — La cortisone retarde l'immunisation du lapin contre le botulisme par l'anatoxine B et l'empêche d'atteindre les titres élevés obtenus chez les témoins. Après injection de rappel, les titres antitoxiques des traités par la cortisone subissent la remontée classique, mais moins élevée que chez les témoins. La cortisone n'est pas à recommander comme adjuvant dans le traitement du botulisme par l'anatoxithérapie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1950, **79**, 1.
- [2] A.-R. PRÉVOT, J. LOISEAU et A. THÉVENARD. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, **136**, 663.
- [3] J. H. CHASE, A. WHITE et T. F. DOUGHERTY. *J. Immunol.*, 1946, **52**, 101.
- [4] EISEN et coll. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, **65**, 301.
- [5] F. G. GERMUTH et B. OTTINGER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **74**, 815.
- [6] L. CARRÈRE et J. ROUX. *Ces Annales*, 1952, **83**, 26.

ÉTUDE DE L'APPAREIL NUCLÉAIRE, DE L'ANTIBIOGRAMME ET DU POUVOIR PATHOGÈNE D'*ACTINOBACTERIUM MEYERI*

par A.-R. PRÉVOT et C. MAZUREK.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

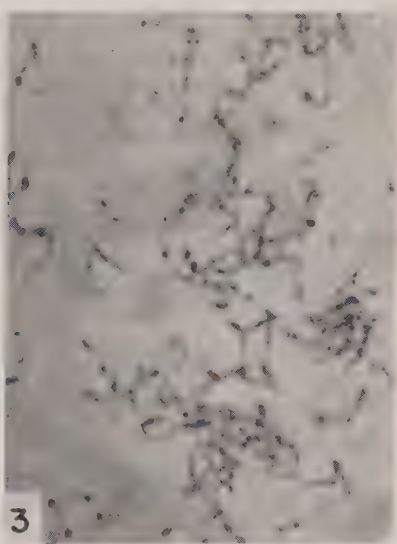
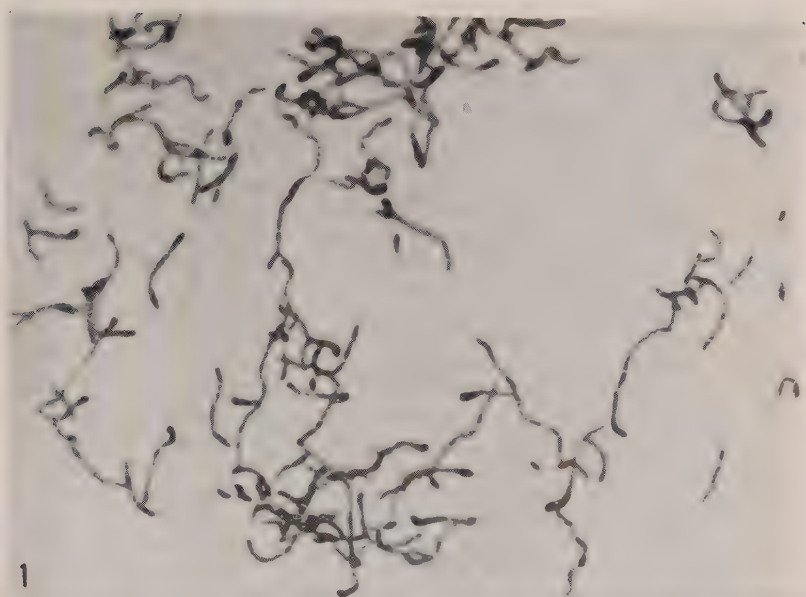
Depuis la description princeps d'*Actinobacterium meyeri* que Kurt Meyer [1] n'avait pas nommé en 1911, mais qu'il considérait comme un actinomycète anaérobie du genre *Cohnistreptothrix* (terme tombé aujourd'hui en désuétude), cette espèce n'avait été retrouvée que quatre fois : deux fois par A.-R. Prévot, une fois par Reynes en 1947 [2] dans un cas de septicémie au cours d'une pleurésie purulente (où la souche isolée était d'ailleurs une variété assez éloignée de l'espèce-type) et une quatrième fois, absolument typique, par R. Vinzent et H. Tataki en 1951 [3] dans un cas de pyorrhée alvéolaire où elle avait été isolée par gingivoculture. Cette dernière souche, malgré les difficultés de sa culture, a permis à ces deux auteurs de compléter sa description ; mais, malgré plusieurs essais de lyophilisation, nous n'avons pas pu la garder pour étudier son pouvoir pathogène par la méthode à la mucine gastrique (les cultures non additionnées de mucine n'étaient pas pathogènes pour le cobaye).

L'isolement d'une nouvelle souche vient de nous permettre de combler cette lacune et au surplus d'étudier l'appareil nucléaire de cette espèce et son antibiogramme.

La souche 881, dont nous donnons la présente étude, a été isolée d'un pus à grains jaunes prélevé dans un abcès fistulisé de la face chez un malade qui avait été envoyé au Service de Mycologie de l'Institut Pasteur par le Dr Lacaille (1), stomatologiste de l'hôpital Cochin. Cette infection se présentait avec tous les caractères d'une actinomycose faciale. L'isolement n'a pu se faire que lentement et uniquement sur les milieux additionnés de sérum frais inactivé et d'extrait de cerveau. Par la suite, la souche a pu pousser sur les milieux simplement additionnés de sérum. Les caractères culturels sont exactement ceux de la souche 628 étudiée par Vinzent et Tataki, sauf sur deux points secondaires : aucun glucide n'est attaqué et le type fermentaire est formo-butyro-lactique au lieu de formo-propionilactique.

I. Morphologiquement, notre souche présentait tous les caractères d'un *Actinobacterium* et nous en reproduisons ci-dessous la photomicrographie. L'importance et le nombre de ses masses nous ont incités à étudier son appareil nucléaire. Celui-ci ne se laisse que difficilement mettre en évidence par la méthode de Robinow-Giemsa. Par

(1) Que nous remercions ici très vivement de sa collaboration.



Actinobacterium meyeri. 1, coloration de Gram;
2, coloration de Robinow-Giemsa; 3, coloration de Piéchaud.

contre, par la méthode de Piéchaud, nous avons pu obtenir des préparations très nettes montrant que l'appareil nucléaire de cette espèce est exactement le même que celui des autres espèces des genres *Actinobacterium* et *Bifidibacterium* [4].

La juxtaposition sur la même figure des photomicrographies de préparations colorées par la méthode de Gram, montrant nettement les massues, et des préparations de l'appareil nucléaire colorées par la méthode de Piéchaud [5] montre que cet anaérobie présente deux sortes de granules nucléaires : les petits granules peu colorés correspondant aux bâtonnets ou segments de bâtonnets ni ramifiés, ni massués, et les gros granules nucléaires très colorés correspondant aux massues et aux points de bifurcation.

II. *In vitro*, par la méthode des disques de Chabbert inclus dans la gélose anaérobie, cette souche s'est montrée très sensible à la terramycine, beaucoup moins à la chloromycétine, à peine à la pénicilline et à l'auréomycine et pas du tout à la streptomycine.

III. *Pouvoir pathogène*. L'injection de culture pure au cobaye ne provoque aucun symptôme. Ceci confirme les recherches récentes [6] faites avec les autres espèces anaérobies du genre *Actinobacterium* (*A. cellulitis*). Par contre, si on ajoute de la mucine gastrique à l'inoculum, le cobaye meurt en neuf jours et à l'autopsie on constate une suppuration circonscrite, adhérente, dure, où l'examen direct révèle des cellules nécrosées et des corps microbiens enchevêtrés dans les polynucléaires nécrosés. Ainsi, *A. meyeri* est pathogène expérimentalement pour l'animal, chez lequel il reproduit une suppuration à grains durs. Le point de départ de l'infection est donc connu et la marche de l'infection est facile à reconstituer : comme tous les *Actinobacterium*, *A. meyeri* est un saprophyte de la cavité buccale, où nous avons vu, par le cas de Vinzent et Tataki, qu'il peut provoquer une infection focale (pyorrhée alvéolaire). Cette infection focale, dans notre cas, a donné par contiguïté une infection jugale se manifestant par la classique tuméfaction aboutissant à la suppuration à grains riziformes jaunes, à pus filant et à fistulisation inguérissable. C'est le processus classique de constitution des actinomycoses aérobie et anaérobies [7]. Mais jusqu'ici aucun cas d'une telle infection n'avait été étudié et nous croyons être les premiers à pouvoir publier un cas d'actinobactériose à *A. meyeri*. Cette trouvaille porte à quatre le nombre des Actinobactérioses connues à ce jour : *A. israeli*, *A. abscessus*, *A. cellulitis* et *A. meyeri*.

CONCLUSIONS.

I. Une souche typique d'*Actinobacterium meyeri* a été isolée pour la première fois d'une actinomycose cervico-faciale humaine de symptomatologie classique.

II. L'appareil nucléaire d'*A. meyeri* est absolument semblable à celui des autres espèces du genre *Actinobacterium* et de *Bifidibacterium bifidum* : petites granulations nucléaires peu colorées dans les formes droites non renflées et grosses granulations nucléaires très colorées dans les massues et aux points de bifurcation des formes ramifiées.

III. L'antibiogramme d'*A. meyeri* est : terramycine > chloromycétine > pénicilline > auréomycine. La streptomycine est inefficace.

IV. L'addition de mucine gastrique à l'inoculum permet de reproduire chez le cobaye une actinomycose typique à grains durs.

V. Cette étude permet de porter à quatre le nombre des Actinobactérioses aujourd'hui connues.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Kurt MEYER. Cité par WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, 1937, page 614.
- [2] F. REYNES. *Arch. Inst. Past. d'Indochine*, 194, **8**, 35.
- [3] R. VINZENT et H. TATAKI. *Ces Annales*, 1951, **81**, 92.
- [4] A.-R. PRÉVOT et C. MAZUREK. *Ces Annales*, 1953 (sous presse).
- [5] M. PIÉCHAUD. *Ces Annales* 1949, **76**, 66 et *Bull. Micr. appl.*, 1951, 2^e série, **4**, 178.
- [6] C. MAZUREK, P. TARDIEUX et A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1952, **83**, 186.
- [7] A.-R. PRÉVOT. *Rapport au VI^e Congrès International de Rome*, 1953 (sous presse).

RELATIONS ANTIGÉNIQUES ENTRE VIBRION CHOLÉRIQUE ET BRUCELLES

II. — SUR LA FRACTION ANTIGÉNIQUE THERMOSTABLE COMMUNE

par J. GALLUT.

(Institut Pasteur.)

Dans une note précédente [1], nous avons rappelé les faits déjà connus de coagglutinité de *V. cholerae* et des *Brucella*, et nous avons établi l'existence d'un antigène thermostable commun à ces deux espèces bactériennes. Nous apportons ici quelques précisions sur ce facteur.

Présent dans les trois souches de *Brucella* essayées (deux souches *Br. melitensis* et une souche *Br. abortus suis*), cet antigène s'identifie, à première vue, pour la souche *Br. abortus suis* type de l'Institut Pasteur, au facteur C de *V. cholerae*, c'est-à-dire au facteur caractérisant le type *Inaba* ou épidémique de ce vibron, dont la formule « O » est AC.

Nous avions alors attribué au facteur spécifique et fondamental A de *V. cholerae* le pouvoir agglutinant résiduel du sérum anti-*Inaba* saturé par *Br. abortus suis*. Ce fait aurait pu, à notre avis, être susceptible d'une application pratique en permettant d'obtenir un sérum cholérique unispécifique A, qui, dans l'état actuel de nos connaissances sérologiques, ne peut pas être obtenu à partir des seuls vibrions cholériques. En effet, si Burrows [2] a bien signalé l'existence d'un quatrième type de *V. cholerae* de formule exclusivement A,

type dont nous avons reconnu nous-même un exemplaire parmi les vibrions isolés en Egypte en 1947, par contre Kauffmann [3], ainsi que Singh et Ahuja [4], ne l'ont pas admis, et il nous paraît qu'il s'agit d'un type antigénique instable.

Il importait donc de vérifier si le sérum anticholérique AC épuisé par *Br. abortus suis* était de ce fait totalement privé du facteur C ; ou, en d'autres termes, si le facteur commun à *V. Inaba* et à *Br. abortus suis* s'identifiait totalement ou partiellement au facteur C.

Expériences. — Nous avons utilisé un sérum anti-O préparé avec le vibron cholérique n° 569 B (souche *Inaba* type du Haffkine Institute de Bombay) titrant 1 p. 2 000. Ce sérum agglutine totalement *Br. abortus suis* à 1 p. 500 et partiellement à 1 p. 1 000 ; saturé par cette *Brucella*, il n'agglutine plus ce germe même à 1 p. 2, tandis qu'il agglutine encore *V. 569 B* à 1 p. 1 000, et le vibron 41 (souche *Ogawa* type du H. I. B.) 1 p. 500.

Nous avons alors épuisé ce sérum cholérique déjà saturé et supposé exclusivement A, par le vibron 41 (formule AB), et nous avons pu constater qu'après cette deuxième saturation il agglutinait encore à 1 p. 200 le vibron 569 B, ainsi que 10 autres vibrions *Inaba* pris au hasard dans notre collection.

Le tableau suivant résume ces opérations : on peut en conclure que *Br. abortus suis* n'absorbe pas la totalité du facteur C du sérum anticholérique.

TABLEAU I. — Taux d'agglutination de *V. cholerae* et *Br. abortus suis* par les sérums anticholériques.

SÉRUMS	<i>V. cholerae</i> <i>Inaba</i> (AC)	<i>V. cholerae</i> <i>Ogawa</i> (AB)	<i>Brucella</i> <i>abortus suis</i>
<i>Inaba</i> (AC)	2 000	1 500	500
<i>Ogawa</i> (AB)	1 800	2 000	0
<i>Inaba</i> saturé par <i>Br. ab. suis</i> . . .	1 000	500	0
<i>Inaba</i> saturé : 1° par <i>Br. ab. s</i> ; 2° par <i>V. Ogawa</i>	200	0	0

En résumé, la parenté antigénique des deux espèces est confirmée, mais cette parenté n'est que partielle. Le facteur commun présent dans *Br. abortus suis* ne représente qu'une fraction du facteur cholérique C. Du point de vue pratique, il n'est donc pas possible d'obtenir un sérum anticholérique unispécifique A par épuisement d'un sérum *Inaba* par *Br. abortus suis*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. GALLUT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 335.
- [2] W. BURROWS, A. N. MATHER, V. G. MCGANN et S. M. WAGNER, *J. inf. Dis.*, 1946, **79**, 168.
- [3] F. KAUFFMANN, *Acta Path.*, 1950, **27**, 283.
- [4] G. SINGH et M. L. AHUJA, *Ind. J. med. Res.*, 1950, **38**, 317.

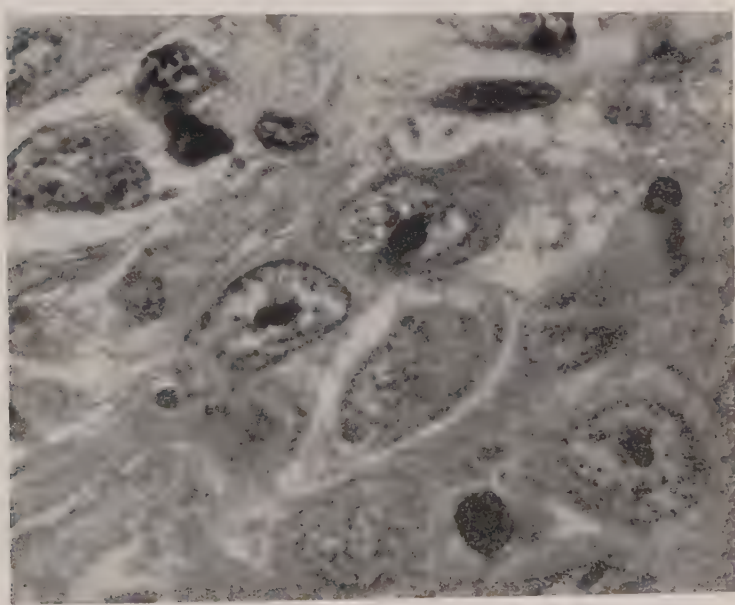
**APPARITION DE CORPS DE NEGRI
DANS LES LÉSIONS PROVOQUÉES PAR LE VIRUS FIXE
(SOUCHE LOUIS PASTEUR)
SOUS L'ACTION DE LA HYALURONIDASE (1)**

par R. BÉQUIGNON, A. GUICHARD et C. VIALAT.

(Institut Pasteur. Service des Virus.)

Les inclusions spécifiques du virus rabique des rues ont été reconnues et décrites pour la première fois au mois de mars 1903 par Negri à la Société médico-chirurgicale de Pavie.

Leur disparition est un des caractères histologiques classiques de la



Corps de Negri au niveau de l'assise externe de la corne d'Ammon
(Service de photomicrographie de l'Institut Pasteur).

fixation du virus, mais il est bien connu que certaines souches de virus fixe, douées d'ailleurs d'autres caractères atypiques, telle celle

(1) La hyaluronidase avec laquelle ces travaux ont été effectués nous a été gracieusement fournie par les Laboratoires Wyeth, que nous tenons à remercier ici.

de Sassari [1], demeurent négrigènes, et que, même avec la souche Louis Pasteur, on peut, sous certaines réserves, mettre en évidence des inclusions chez certaines espèces animales (muridés), au niveau des zones électives du névraxe, et en usant de colorations spéciales.

Nous avons antérieurement [2] montré que l'addition de bave de chien normal ou de hyaluronidase à une suspension de virus fixe (souche Louis Pasteur) conférait à celui-ci la virulence par voie sous-cutanée chez le lapin et faisait apparaître au cours de passages successifs, des modifications cliniques et histologiques telles que l'on pouvait conclure à un retour du virus fixe au virus originel [3].

Ces lésions histologiques ont été retrouvées au cours de passages successifs par voie cérébrale, au lapin, de la souche modifiée, qui tue l'animal en seize jours. Elles consistent principalement en inclusions cytoplasmiques oxyphiles, offrant les affinités tinctoriales et la structure classiquement attribuées aux corps décrits par Negri, siégeant au niveau de l'assise externe de la corne d'Ammon (fig.)

Ces modifications cliniques et histologiques paraissent confirmer la possibilité de « retour en arrière » dans certaines conditions, du virus fixe (souche Louis Pasteur) isolé en 1882, dont les lésions et les caractères cliniques ont été assez bien observés chez les lapins de Paris depuis cinquante années.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. LÉPINE et V. SAUTTER. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 542.
[2] R. BÉQUIGNON, R. LAMY et C. VIALAT. *Ces Annales*, 1949, **76**, 283.
[3] R. BÉQUIGNON et C. VIALAT. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 897.

ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES LÉSIONS CELLULAIRES DE LA POLIOMYÉLITE EN CULTURE *IN VITRO* SUR UNE SOUCHE DE FIBROBLASTES HUMAINS

par G. BARSKI, M. ENDO et V. MONACI (*).

(Institut Pasteur. Service des Virus [D^r P. LÉPINE].)

Au cours de l'étude de la culture du virus de la poliomyélite sur des fragments d'amygdales humaines, explantés *in vitro* [1, 2], nous avons constaté l'apparition puis l'augmentation de la susceptibilité de ce tissu au virus.

Nous avons pu isoler par repiquages successifs des souches de fibroblastes humains d'origine tonsillaire se distinguant par une sensibilité régulière au virus. Ces fibroblastes de souche présentent de

(*) Boursier de l'O. M. S.

plus une stabilité morphologique remarquable et une absence de dégénérescence non spécifique au cours de transferts en différents milieux.

C'est sur un tel matériel cellulaire (souche A III) que nous avons entrepris une étude de l'évolution des lésions cellulaires causées *in vitro* par le virus.

Matériel et méthodes. — La souche de fibroblastes employée a, à son origine, une amygdale prélevée chez un enfant de 5 ans. Les cellules sont cultivées avant leur utilisation pour nos expériences pendant cent jours environ en tubes roulants, dans un milieu à base de sérum placentaire humain (20 p. 100), de sérum de cheval (15 p. 100), de sérum ultrafiltré (10 p. 100), d'extrait embryonnaire de poulet (15 p. 100) et de solution de Hanks (40 p. 100).

Nous avons utilisé 2 souches de virus : Mahonay (type 1) et MEF₁ (type 2) (1).

Quarante-huit heures avant l'introduction du virus, les cultures sont transférées dans un milieu d'où le sérum placentaire humain est éliminé. Cela suffit pour les rendre sensibles au virus.

La culture se fait en tubes roulants selon la technique suivante :

On introduit dans un tube de 160 × 16 mm stérile une lamelle également stérile de 9 × 32 mm. On verse ensuite dans le tube 1 cm³ environ de solution à 6 p. 100 de Formvar dans du dichloréthane, prenant soin de largement mouiller l'intérieur du tube. Aussitôt on aspire la solution, on bouche le tube au coton et on le laisse sécher à l'étuve pendant vingt-quatre heures. A la suite de cette opération, toute la surface intérieure du tube et de la lamelle est recouverte d'une très fine pellicule de Formvar qui fixe en même temps les bords de la lamelle au tube.

La surface de Formvar est plus favorable à l'étalement des cellules que le verre et avec un minimum de plasma, on arrive à obtenir des colonies cellulaires qui prolifèrent vite et adhèrent bien à la surface de la lamelle. Ces colonies cellulaires se prêtent très bien à la fixation et aux colorations, ces deux opérations se faisant à l'intérieur des tubes.

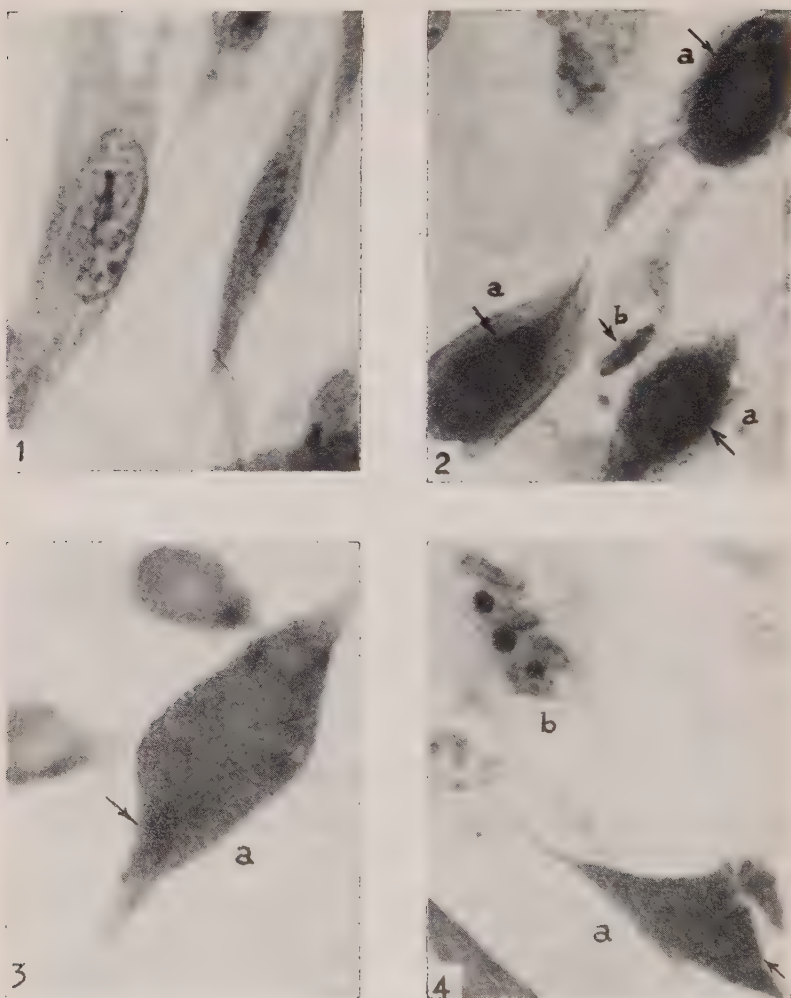
Les cultures fixées au Bouin-Duboscq-Brazil et au Carnoy ont été colorées à l'hémalun-éosine, au Unna-Pappenheim modifié par Brachet [3] et par la méthode de Feulgen. Certaines préparations sont colorées au Giemsa après fixation à l'alcool méthylique.

RÉSULTATS. — L'évolution du processus infectieux dans nos cultures de souches de fibroblastes tonsillaires est extrêmement rapide, beaucoup plus rapide que celle qu'on observe dans les cultures de tissus fraîchement explantés.

Les lésions cellulaires caractéristiques commencent à apparaître, avec les deux souches du virus, quinze à vingt-quatre heures après inoculation de la culture.

Dans des cultures infectées depuis vingt-quatre à quarante-huit heures, on peut observer, à côté de cellules normales, d'autres cellules qui se trouvent aux différents stades du processus infectieux, stades allant jusqu'à la destruction finale. Cette diversité de degré de dégénérescence spécifique est très particulière pour les cultures d'infection récente.

(1) Ces souches ont été remises au Dr Lépine par le Dr J. E. Salk, à qui nous exprimons nos remerciements.



Différents aspects de fibroblastes humains de la souche A III d'origine tonsillaire, quarante heures après l'infection avec le virus poliomyélique (type I Mahonay). Coloration : fig. 1 et 2, hémalum-éosine ; fig. 3 et 4, Unna Pappenheim.

FIG. 1. — Fibroblastes normaux.

FIG. 2. — *a*, fibroblastes au premier stade d'atteinte : masse éosinophile du centre de la cellule, noyau repoussé vers les bords ; *b*, stade suivant : cytoplasme « vide » et noyau replié.

FIG. 3 et 4 — *a*, cellules avec cytoplasme fortement pyroninophile et noyau repoussé ; *b*, avec cytoplasme pâle et noyau contenant d'abondantes granulations chromatiniques (vert) et de volumineux nucléoles (rouge vif).

Les flèches sur les figures 2, 3 et 4 indiquent le noyau.

Sur des préparations fixées et colorées on observe, dès la *quinzième heure*, l'apparition dans le cytoplasme, vers le centre de la cellule, d'une masse homogène, hyaline, arrondie ou ovalaire, parfois multiple, très fortement éosinophile.

Cette masse repousse le contenu cellulaire, protoplasme et noyau, vers la périphérie et, en la gonflant, déforme la cellule. Cette déformation est bien visible au faible grossissement sur les cultures vivantes.

A ce moment, la basophilie du protoplasme augmente fortement, et si on observe l'ensemble de la colonie cellulaire, les fibroblastes atteints par l'infection se distinguent à ce stade précoce par une teinte générale violacée intense au Giemsa et une forte pyroninophilie. La basophilie atteint à ce moment la formation éosinophile centrale.

Dans le cytoplasme repoussé vers les bords du territoire cellulaire apparaissent souvent des granulations basophiles Feulgen positives, très probablement d'origine nucléaire.

Le noyau s'altère en même temps qu'apparaît la masse éosinophile centrale, sa membrane se plisse, les nucléoles se déforment parfois, mais restent fortement basophiles et très intensément pyroninophiles. Entre temps, la substance chromatinique, Feulgen positive du noyau se densifie, ce qui correspond à une intense coloration au vert de méthyle (Unna-Pappenheim).

Au stade suivant la colorabilité de la masse centrale diminue ainsi que la basophilie générale du cytoplasme. La cellule se vide de son contenu cytoplasmique, mais le noyau reste toujours très basophile avec des agglomérations chromatiniques Feulgen positives fortement colorables au vert de méthyle, et des nucléoles toujours intensément rouges à la pyronine. Par la suite, les nucléoles disparaissent, et de la cellule il ne reste qu'un noyau replié souvent en forme de croissant, conservant longtemps encore sa réaction de Feulgen positive sur le fond du cytoplasme acidophile, très faiblement coloré.

Cette image d'une maladie cellulaire d'allure foudroyante est bien particulière et très différente d'une dégénérescence banale qu'on peut observer dans des cultures exposées à des conditions chimiques ou physiques défavorables.

DISCUSSION et CONCLUSION. — Bien que la cytopathologie *in vitro* de la poliomyélite paraisse s'éloigner de ce qu'on observe dans les neurones chez l'animal ou chez l'homme atteint de poliomyélite (Bodian [4] et Caspersson [5]), on peut établir des points communs pour les deux processus infectieux causés par le même virus sur des terrains différents. Ces points sont : *d'abord atteinte du cytoplasme avec augmentation de sa basophilie, puis apparition de lésions nucléaires*. Ces lésions consistent, dans les deux cas, en augmentation de masses chromatiniques et en distorsion finale du noyau qui peut pourtant assez longtemps conserver, ainsi que ses nucléoles, un aspect peu altéré dans une cellule déjà fortement atteinte par le virus.

Il est intéressant de constater que Kaplan et Melnick [6], en étudiant la distribution du virus de la poliomyélite entre le cytoplasme et le noyau des cellules du névraxe de souris à des stades successifs d'infection, ont obtenu, à l'aide de méthodes différentes, des résultats qui concordent avec nos observations. D'après ces auteurs, le virus

apparaît et augmente, tout d'abord dans la fraction dite cytoplasmique et ensuite dans la fraction dite nucléaire de leurs préparations obtenues par extractions et centrifugations fractionnées. Dans un autre travail et avec un matériel tissulaire analogue, Schwerdt et Pardee [7] ont trouvé le virus associé surtout à la fraction microsomique du cytoplasme. Par contre, nous n'avons pas trouvé *in vitro* d'inclusions acidophiles intranucléaires de type B (classification de Cowdry [8]), qu'on voit souvent dans les neurones détruits par le virus *in vivo*. Les seules formations acidophiles que nous ayons observées *in vitro* ont une localisation cytoplasmique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. LÉPINE, G. BARSKI, V. MONACI et G. DE BRION. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 155.
- [2] G. BARSKI, P. LÉPINE, V. MONACI et G. DE BRION. *Ces Annales*, 1953, **84**, 825.
- [3] L. LISON. *Histochemie et Cytochimie animales*, Paris, Gauthier-Villars, 1953.
- [4] D. BODIAN. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1948, **83**, 1.
- [5] T. O. CASPERSSON. *Cell growth and cell function*, New York, W. W. Norton and Company, 1950.
- [6] A. S. KAPLAN et J. L. MELNICK. *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 91.
- [7] O. E. SCHWERDT et A. B. PARDEE. *J. exp. Med.*, 1952, **96**, 121.
- [8] E. V. COWDRY. *Arch. Path.*, 1934, **48**, 527.

ESSAI D'OBTENTION CHEZ LA CHÈVRE, LE MOUTON ET LE CHIEN D'ANTICORPS DÉCELANT LES ANTIGÈNES ÉRYTHROCYTAIRES HUMAINS M ET N

par A. EYQUEM et J. FINE.

(Institut Pasteur. Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

La mise en évidence d'agglutinogènes de groupes sanguins chez l'homme a été réalisée à l'aide d'iso-immunsérums, pour la plupart des antigènes récemment individualisés (Duffy, Kell, Lewis, Jka).

Au contraire, la découverte des antigènes globulaires M et N humains avait pu être réalisée par Landsteiner et Levine, en 1927, grâce à des hétéro-immunsérums de lapins, convenablement absorbés. Il en fut de même pour le facteur Rh standard (Landsteiner et Wiener, 1937).

A l'opposé, on n'a que rarement étudié les propriétés des hétéro-immunsérums préparés chez d'autres animaux.

On ne dispose actuellement, comme sérums anti-M et anti-N, que d'hétéro-immunsérums de lapins immunisés par l'injection de globules d'individus des groupes OM et ON et ensuite débarrassés de

leur agglutinine hétéro-spécifique par des globules appropriés, c'est-à-dire capables d'absorber cette dernière tout en respectant l'immun-agglutinine anti-M ou anti-N obtenue.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de rechercher si d'autres espèces animales seraient susceptibles de réagir à une telle immunisation et, notamment, nous avons tenté d'obtenir des hétéro-immunsérums par immunisation de chèvres [2], de mouton [1] et de chiens [2].

En premier lieu, nous avons voulu voir si, comme le pensait Haebara [1], il existait chez la chèvre des agglutinines anti-M et anti-N naturelles.

A l'opposé, Helmstädtter [2], de l'examen de 681 sérums de différents animaux, a conclu que le mouton et la chèvre ne possédaient pas d'agglutinines naturelles anti-M et anti-N. Cet auteur n'avait, dans aucun cas, sur 197 moutons et 70 chevreaux examinés, décelé la présence de ces agglutinines.

Examinant le sérum de 20 chèvres et de 20 moutons normaux, nous sommes arrivés aux mêmes conclusions :

D'une part, les différences de titres obtenues ne sont pas significatives entre les titrages effectués avec les globules OM, ON et OMN ; d'autre part, les agglutinines décelées ne sont pas spécifiquement respectées par des absorptions sélectives. Quant aux titres des agglutinines anti-globules rouges humains, ils sont beaucoup plus élevés chez les chèvres que chez les moutons. Ces titres sont compris entre le 1/16 et 1/4 000, le titre moyen se situant autour de 1/1 000 pour les chèvres, et entre 1/8 et 1/128, avec titre moyen de 1/32, pour les moutons.

Nous avons effectué les immunisations à l'aide de globules d'individu du groupe OM CDe/cde, en employant toujours les globules du même individu pour les immunisations anti-M, et d'individu du groupe ON cde/cde de 2 donneurs pour la préparation de l'anti-N.

Ces globules étaient recueillis sur citrate de soude, lavés quatre fois stérilement, et remis en suspension en eau physiologique pour obtenir une dilution finale de 50 ou de 30 p. 100.

Deux chevreaux (l'un immunisé anti-M, l'autre immunisé anti-N, et 1 mouton (anti-M) reçurent leurs deux premières injections par voie infra-jugulaire à un intervalle de quatre jours. La quantité injectée était de l'ordre de 10 à 15 cm³. Les autres injections furent continuées par voie intramusculaire pendant un mois et demi pour atteindre un total de quinze injections. Les deux chiens ont également reçu deux fois par semaine, par voie uniquement intraveineuse, 2,5 cm³ de globules rouges OM ou ON à 50 p. 100 puis, au bout de quatorze injections intraveineuses et après un repos de treize jours, une injection de rappel.

Les sérums obtenus contenant des agglutinines hétéro-spécifiques, nous avons été amenés à les absorber par des hématies O et A dépourvues de l'agglutinogène contre lequel on a cherché l'obtention d'une agglutinine. Il faut signaler que ces absorptions ne sont régies par aucune règle absolue et qu'il est nécessaire de procéder à de nombreux essais sur de petites fractions de sérums, de n'absorber un sérum que sur des fractions de celui-ci à l'aide d'absorptions successives de peûr

d'entraîner l'agglutinine anti-M ou anti-N spécifique concurrentement avec les agglutinines hétéro-spécifiques, soit par une absorption trop poussée, soit surtout par un trop gros volume globulaire employé. Les résultats des titrages effectués sur les différents animaux immunisés sont résumés dans le tableau ci-joint.

Animaux immunisés	Titres Anti-M Anti-N (anti-humain) 12-12-52	Titre après la 1ère injection intra-veineuse 16-12-52	Titre après 1 mois d'immunisation 14-1-53	Titre après 1 mois 1/2 d'immunisation 2-2-53.	Titres Anti-M ou Anti-N après absorption par des Globules appropriés				
					CHEVREAU OM	CHEVREAU ON	MOUTON OM	CHIEN 17 OM	CHIEN 24
CHEVREAU OM	OM - 126 ON - 512	OM - 512 ON - 512	OM - 8000 ON - 4000	OM - 16.000 ON - 8.000				OM - 4 ON - 4	OM - 8 ON - 8
CHEVREAU ON	OM - 64 ON - 256	OM - 2048 ON - 2048	OM - 4000 ON - 8000	OM - 4.000 ON - 4.000				OM - 2 ON - 2	
MOUTON OM	OM - 126 ON - 128	OM - 64 ON - 128	OM - 1024 ON - 512	OM - 1.024 ON - 512					
CHIEN 17 OM	OM - 32 ON - 32		OM - 256 ON - 512	OM - 126 ON - 128					
CHIEN 24 ON	OM - 32 ON - 16		OM - 256 ON - 256	OM - 32 ON - 32					
1ère Absorption	OM - 2048 ON - 2048	OM - 32 ON - 32	OM - 126 ON - 4	OM - 4 ON - 4					
2ème Absorption	OM - 512 ON - 512	OM - 4 ON - 4	OM - 16 ON - 0	OM - 2 ON - 2					
3ème Absorption	OM - 512 ON - 512	OM - 4 ON - 4							

Nous avons ainsi réussi à produire un hétéro-immun-sérum anti-M par immunisation chez le mouton.

Les immunisations tentées sur 2 chevreux et 2 chiens n'ont pas entraîné la formation d'une agglutinine anti-M ou anti-N spécifique.

Nous avons recherché également si ces derniers animaux avaient répondu à l'immunisation par des anticorps uniquement décelables à l'aide de globules traités par un enzyme protéolytique. Les titres d'agglutination vis-à-vis de globules rouges OM et ON traités par un enzyme protéolytique ne se sont montrés que de deux dilutions supérieurs aux titres rencontrés vis-à-vis des globules rouges normaux.

Nous avons voulu, de plus, vérifier si l'absence d'immunisation des chiens, par exemple, n'était pas due à la présence d'antigènes érythrocytaires M ou N masqués. Un sérum anti-M ou anti-N mis en présence des globules rouges des deux chiens sur lesquels on avait tenté une immunisation ne subit pas, après un séjour de dix-huit heures à la glacière, une diminution notable de son titre agglutinant.

En conclusion, il nous a paru intéressant de signaler l'obtention d'un hétéro-immun-sérum anti-M obtenu par immunisation du mouton, cet animal étant capable de produire quantitativement un volume de sérum anti-M plus important que le lapin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. HAEBARA. *J. Med. Assoc. Formosa*, 1938, **37**, 196.
- [2] F. HELMSTADTER. *Hyg. Inst. Univ. Köln. Dissert.*, 1939.
- [3] S. OLBRICH. *Zentralbl. Bakt. I.*, 1939, **144**, 252.

UNE NOUVELLE ESPÈCE DE *SALMONELLA* ISOLÉE CHEZ UN CORBEAU (*CORVUS CORAX*) : *S. HESSAREK*

par R. NÉEL, L. LE MINOR et M. KAWEH.

(*Institut d'Etat des Sérums et Vaccins. Institut Razi.
Hessarek, Iran et Institut Pasteur de Paris.*)

En janvier 1953, l'un de nous trouve, dans le parc de l'Institut Razi, le cadavre d'un corbeau, appartenant à l'espèce *Corvus corax*.

A l'autopsie, on observe une congestion des poumons ; l'intestin est hémorragique. L'hypothèse d'une forme aiguë de salmonellose est plausible. L'hémoculture, pratiquée à partir du sang du cœur, donne en vingt-quatre heures une culture pure d'un bacille mobile, Gram-négatif, dont la culture sur gélose, après isolement et repiquage, est agglutinée instantanément par le sérum polyvalent OMI.

L'agglutination, sur lames ou en tubes, est positive avec les sérums IV, a, 1-2 à 1-7 et 5 saturé. Les caractères biochimiques, recherchés parallèlement, confirment aussi le diagnostic de *Salmonella*, tout en mettant en évidence des propriétés très anormales pour une espèce du groupe B.

Aucune *Salmonella*, actuellement décrite, ne correspond aux formules antigénique et biochimique trouvées.

N. B. — La souche est conservée sous le numéro 577 de la collection microbienne de l'Institut Razi.

a) *Caractères morphologiques et biochimiques.* — Les colonies sur gélose sont du type S normal.

Les épreuves biochimiques donnent les caractères généraux et différentiels suivants :

1° KNO ₃	+ 1	M. R.	+ 4
Urée	o 4	V. P.	o 4
Indol	o 2	Citrate (Simmons)	+ 2
Lactose	o 30	Glucose	+ 1
Saccharose	o 30	Maltose	o 30
Adonite	o 30	Mannite	+ 1
Salicine	o 30	Sorbite	+ 1
Gaz en glucose			+ 1
2° Arabinose	o 30	H ₂ S	+ 1
Dulcité	+ 1	Stern-glycérol	o 8
Inosite	o 30	Gélatine	o 60
Rhamnose	+ 1	d-Tartrate	+ 1
Tréhalose	+ 1	Citrate	+ 3
Xylose	+ 22	(par la suite)	+ 1

Sont donc à souligner :

La non-fermentation du maltose ;

La non-attaque de l'arabinose ;

L'utilisation tardive du xylose ;

Enfin, la négativité du Stern-glycérol.

Tous ces caractères ont été retrouvés chez les souches isolées chez la souris, le cobaye et le pigeon au cours de l'étude du pouvoir pathogène expérimental.

b) *Formule antigénique.* — Pour confirmer la structure antigénique, nous avons dû recourir à la préparation séparée des sérums O et H, respectivement par la méthode de Roschka et celle du bouillon formolé, l'inoculation intraveineuse de 0,25 cm³ d'une émulsion vivante ajustée à 1 milliard par centimètre cube ayant entraîné la mort des lapins, deux fois consécutivement.

De ce fait, pour mettre en évidence la présence de l'antigène V, qui est du type K et relativement thermolabile, nous avons recherché l'agglutination sur lames avec notre sérum V dont la dilution est de 1/10 : elle était négative ; en tubes, l'agglutination était faiblement positive au taux de 1/50. La souche renferme donc des traces d'antigène V, toujours associé à l'antigène IV dans les formes S d'après Kauffmann (*Enterobacteriaceae*, 1951, p. 41).

Agglutinogènes O. — Les saturations sur sérum dilué au 1/10 ou les épreuves d'agglutination ont été conduites avec les souches suivantes de l'Institut Pasteur de Paris (Centre des *Salmonella*) :

S. typhi O 901 (XII, 1, 2, 3),

S. paratyphi A 507 (I, II, XII),

S. essen 173 (IV, XII).

Le résultat de ces épreuves est consigné dans le tableau I.

La formule antigénique O est donc IV, XII.

Agglutinogènes H. — Les saturations sur sérum dilué au 1/20 ou

TABLEAU I.

SÉRUM O	<i>S. typhi</i>	<i>S. para A</i>	<i>S. essen</i>	577
Sérum non saturé. . . .	1/600	1/100	1/1 000	1/2 500
S. saturé par <i>S. typhi</i> . .	0	0	1/1 000	1/2 500
S. précéd. sat. <i>S. essen</i> .			0	0

les épreuves d'agglutination H ont été menées avec les souches suivantes :

S. cholerae suis var. *kunz.* 5120 (1,5),

S. newport 563 non spécifique (1,2),

S. london 1446 non spécifique (1,6),

S. archavaleta non spécifique (1,7),

S. paratyphi A 507 (a).

Les résultats obtenus sont condensés dans le tableau II.

TABLEAU II.

SÉRUM H	<i>S. newp.</i> <i>S. lond.</i>	<i>S. arch.</i>	<i>S. ch. su.</i>	<i>S. para. A</i>	577
Sérum non saturé.	1/1 600	1/6 400	1/25 600	1/6 400	1/31 200
S. saturé <i>S. ch. suis.</i> . . .	0	1/160	0	1/6 400	1/12 800
S. précéd. sat. <i>S. par. A.</i> .		1/160		0	1/640

Inversement, la souche 577 sature un sérum anti-a et un sérum anti-1,5. Elle ne sature pas les sérums anti-1,2, 1,6, 1,7.

La formule antigénique H est donc : a — 1,5. Le reste antigénique n'a pas pu être absorbé malgré plusieurs saturations répétées.

c) *Pouvoir pathogène expérimental.* — Il a été recherché sur la souris, le cobaye et le pigeon.

Souris blanche : 4 souris inoculées avec 0,5 cm³ d'une dilution au 1/20 d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures, par voie intrapéritonéale, sont mortes en vingt-quatre à quarante-huit heures. L'hémoculture était positive.

Par voie buccale, 2 souris ont absorbé des grains broyés mélangés à 5 cm³ d'une même culture. Elles sont mortes le quinzième jour : la première présentait un intestin noirâtre, comme liquéfié, l'hémoculture était positive ; la deuxième avait un intestin légèrement hémorragique avec coproculture positive.

Cobaye : 2 cobayes, inoculés, par voie intrapéritonéale, avec 0,5 cm³ d'une dilution au 1/20 d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures sont morts en quatre jours de péritonite généralisée. L'hémoculture était positive.

Par voie sous-cutanée, à la même dose, formation d'un abcès local fistulisé avec culture du pus positive.

Pigeon : 4 pigeons sont nourris avec du grain, auquel a été mélangé 10 cm³ d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures. Sacrifiés après un mois d'observation, 3 d'entre eux ne présentent aucun symptôme pathologique : autopsie et coproculture sont négatives. Par contre, le quatrième meurt le seizième jour : l'intestin est légèrement hémorragique et l'hémoculture est positive.

La souche était donc très virulente, quelle que soit la voie utilisée.

d) *Epidémiologie*. — Bien qu'isolée chez un corbeau ayant présenté une forme aiguë de salmonellose, cette salmonelle n'a dû contaminer qu'accidentellement cet oiseau, qui se nourrit en particulier de charogne. Jusqu'à présent, nous n'avons pas pu trouver l'origine de cette contamination.

e) *Conclusion*. — En résumé, nous avons isolé chez un corbeau, appartenant à l'espèce *Corvus corax*, et mort de salmonellose aiguë, une nouvelle espèce de *Salmonella*, que nous avons appelée *S. hessarek* et dont la formule antigénique est : IV, XII — a — 1,5.

La souche n'attaque ni le maltose, ni l'arabinose.

NOUVELLE TECHNIQUE D'INOCULATION AU COBAYE DE PRODUITS SURINFECTÉS POUR LA RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX. USAGE DE L'AURÉOMYCINE

par F. TISON.

(*Sanatorium de Praz-Coutant.*)

L'inoculation au cobaye reste, en matière de tuberculose, une méthode plus sensible que la culture [1, 2], à condition que le produit pathologique ne subisse pas de traitement chimique, qui, dans le but d'éliminer les germes banaux, détruit les bacilles tuberculeux en grande partie [3].

C'est pourquoi nous avons préconisé une méthode à la pénicilline [4], qui nous a donné des résultats remarquables [5] pour une série de 2 272 cobayes.

Cependant, depuis quelques mois, les résultats semblaient moins bons et certains cobayes présentaient, malgré l'antibiotique, une réaction suppurée au point d'inoculation. De rares animaux en mouraient.

Devant les constatations de Chabbert [6], nous avons voulu vérifier que la flore des crachats devenait, dans l'ensemble, moins sensible à la pénicilline.

Nous avons testé *in vitro* 83 crachats vis-à-vis de 5 antibiotiques :

67 étaient résistants à la pénicilline (10 U.O.)	} par cm ³ de milieu.
19 étaient résistants à l'auréomycine (60 µg)	
18 étaient résistants à la terramycine (60 µg)	
16 étaient résistants à la chloromycétine (60 µg)	
63 étaient résistants à la streptomycine (100 µg)	

Ceci explique en partie les quelques déboires de ces dernières inoculations.

Nous avons cru alors pouvoir nous adresser à d'autres antibiotiques.

Parmi ceux-ci, l'*auréomycine* était le plus tentant.

L'action prolongée, *in vitro*, à l'étuve n'a pas été retenue, car nous craignons une action sur le bacille de Koch [7, 8, 9].

Restait le choix entre deux méthodes : ou traiter l'animal dans les jours qui suivent l'inoculation (ce qui aurait été de pratique difficile ou fastidieuse), ou éviter une réaction locale néfaste.

Des premiers essais ont été faits en pratiquant simultanément l'injection du crachat sous la peau de la cuisse gauche et une injection d'*auréomycine* au flanc droit. Si une partie des abcès était évitée, la méthode ne nous a pas, cependant, donné entière satisfaction.

Nous nous sommes alors arrêté à la technique suivante :

Mélanger le crachat (ou produit pathologique surinfecté) avec 2 cm³ de sérum physiologique contenant 1 cg d'*auréomycine* ;

Dix minutes après, injection du mélange sous la peau de la cuisse gauche.

La présence d'*auréomycine in situ* est très utile, et, de plus, les germes sont préparés *in vitro*, par contact avec l'antibiotique, à une phagocytose accrue [10], phagocytose qui, chez le cobaye, peut quelque chose contre les germes banaux, non contre le bacille tuberculeux [11]. Contrairement à la pénicilline, l'*auréomycine* ne se révèle pas toxique pour le cobaye.

Nous avons voulu faire une comparaison valable avec la méthode la plus précise et la plus sensible, soit celle à la pénicilline [4].

Les crachats ont été soigneusement partagés en deux parties, et chaque moitié a été inoculée à un cobaye selon l'une ou l'autre méthode.

Notre attention a été spécialement attirée par :

L'apparition et l'intensité de l'allergie à la tuberculine au 1/10 ;

L'apparition d'abcès banaux ou de réaction au point d'inoculation ;

Les lésions tuberculeuses à l'autopsie.

L'expérience porte sur 66 cobayes, soit deux groupes de 33.

Les produits inoculés étaient négatifs aux examens optiques, donc, au plus, pauci-bacillaires. Nous avons craint, en effet, que l'utilisation de produits très positifs ne donne une tuberculisation forte, donc de gradation moins franche.

On peut constater que quatre fois le cobaye est mort avec la technique à la pénicilline, alors qu'un seul est mort avec la nouvelle technique à l'*auréomycine*.

Pour le n° 23, deux fois la méthode à la pénicilline a été recommencée, les deux fois l'animal est mort en quelques jours.

Les résultats concernant l'allergie et les lésions tuberculeuses sont, d'autre part, assez nettement en progrès sur l'ancienne méthode. L'ancienne méthode donne 16 résultats positifs contre 22 pour la nouvelle méthode.

La présence plus fréquente de réaction locale, abcédée ou non, explique ces différences. Nous avons consacré une étude serrée à ce sujet [12].

N°	Intensité de l'intra-dermo réaction		Lésions tuberculeuses à l'autopsie	
	P	A	P	A
1	o	o	o	o
2	mort d'infection	++	mort	+
3	+	+	++	+
4	o	o	o	o
5	o	+	o	+
6	o	o	o	o
7	+	++	+	++
8	+	+	++	+++
9	+	++	++	++
10	+	+	+	++
11	+	+	+	++
12	o	o	o	o
13	+	mort d'infection	++	mort
14	o	o	o	o
15	o	o	o	o
16	+	+	+	+++
17	o	o	o	o
18	++	++	+	+
19	++	++	++	++
20	+	+	+	+
21	+	++	+	+
22	o	o	o	o
23	mort d'infection	+	mort	+
24	o	+	o	++
25	mort d'infection	+	mort	+
26	+	++	++	++
27	+	+	++	+++
28	mort d'infection	+	mort	++
29	o	o	o	o
30	++	++	+	++
31	o	++	o	+++
32	o	o	o	o
33	+	+	+	++

Cette petite série, à elle seule, était démonstrative. La pratique courante nous a montré depuis que cette technique avait de gros avantages.

Certes, cette expérimentation, portant sur 66 animaux, est un peu courte, mais l'absence de discordance dans les résultats nous incite à poursuivre les recherches.

Cette technique doit, en tout cas, être dès maintenant appliquée aux inoculations de culot de centrifugation d'urine, de pus d'otite, ou de tout produit souillé par des germes Gram-négatifs pathogènes pour le cobaye. Elle présente dans ces cas des avantages très nets.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. LOWYS et F. TISON. *Pédiatrie*, 1952, **7**, 7.
- [2] F. TISON. *Semaine Hôp. Paris*, 1949, **9**, 389.
- [3] F. TISON. *Ces Annales*, 1947, **73**, 186. *
- [4] F. TISON. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1024.
- [5] F. TISON. *Ces Annales*, 1951, **80**, 551.
- [6] Y. CHABLERT et TERRIAL. *Ces Annales*, 1952, **83**, 499.
- [7] M. STEINBACH, H. BAKER et J. Ch. DUCA. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **74**, 596.
- [8] G. RAKEG et R. DONOVICK. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1949, **60**, 143.
- [9] T. L. PERRY. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **72**, 45.
- [10] S. LAMBIN et A. DESVIGNES. *Ces Annales* 1953, **84**, 745.
- [11] Rapport au XI^e Congrès de la Tuberculose. Masson édit., 1953.
- [12] F. TISON. *Ces Annales*, 1948, **74**, 512.

ACTION DES AGENTS TENSIOACTIFS SUR LE BACILLE DE KOCH : LE TWEEN 80

par D. LUZZATI (*).

(Laboratoire de Physico-Chimie
de la Faculté de Médecine de Paris.)

L'utilisation du milieu de Dubos pour la culture du B. K. s'est amplement répandue au cours de ces dernières années. Ce milieu présente en effet de nombreux avantages sur les milieux liquides usuels. Entre autres, il permet une culture diffuse en profondeur, sans formation de voile ni d'amas ; on peut ainsi obtenir des inoculats uniformes, faire des numérations ou suivre la croissance du B. K. en employant les techniques utilisées pour les autres bactéries. En outre, la croissance du B. K. est plus rapide sur le milieu de Dubos que sur les milieux liquides courants [1, 2]. Rappelons que la caractéristique principale de ce milieu, par rapport aux milieux liquides usuels, est la présence de Tween 80 (0,06 p. 100) et de sérum albumine cristallisée (0,35 p. 100).

Ayant étudié précédemment [3] l'action dispersante du Tween, nous nous sommes attaché, au cours du présent travail, à préciser l'influence du Tween sur la croissance du B. K.

Nous nous sommes servi de la technique employée au cours d'un travail antérieur [4]. Nous avons utilisé la souche aviaire 923 (lisse) de l'Institut Pasteur, les cultures étant continuellement agitées à l'étuve à 37°, ce qui permet d'obtenir une culture diffuse, donc une

(*) Travail effectué avec l'aide de l'Institut National d'Hygiène.

comparaison valable des courbes de croissance en milieu avec et sans Tween 80 (1). Nous avons utilisé le milieu de base suivant :

Asparagine.	4 g
Acide citrique.	2 g
SO ₄ Mg. 7H ₂ O.	0,5 g
PO ₄ H ₂ K	0,5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,05 g
Eau distillée.	500 g

On répartit 10 cm³ de ce milieu dans des erlenmeyers de 50 cm³, puis on ajoute la quantité voulue d'une solution de glycérine à 50 p. 100 ou de Tween à 5 p. 100, et l'on complète à 20 cm³ avec de l'eau distillée, de façon à avoir une concentration en sels et en source d'azote identique à celle du milieu de Sauton. On ensemence avec une dilution (dans le milieu de base) de 1/50 à 1/100 de bactéries cultivées sur milieu de Sauton, en fin de phase logarithmique, de façon à obtenir une concentration bactérienne finale de 1 à 2 × 10 bactéries par centimètre cube.

Nous avons pu constater que l'adjonction de Tween 80 au milieu de Sauton (c'est-à-dire au milieu de base contenant 5 p. 100 de glycérine) augmente la vitesse de croissance de la culture (fig. 1). Les temps de division sont de vingt-deux heures sur Sauton seul et de quatorze heures sur Sauton additionné de 1 p. 100 de Tween 80. Schaeffer avait d'ailleurs déjà montré que la vitesse de croissance et le rendement de souches bovines disgoniques et de souches aviaires augmentaient en fonction de la quantité de Tween ajouté au milieu de culture, contenant par ailleurs du glucose [6].

D'autre part, nous avons constaté que le B. K. est susceptible d'utiliser le Tween comme seule source de carbone (fig. 2). Il s'agit d'ailleurs d'une excellente source de carbone pour cette bactérie, meilleure même que la glycérine, du moins dans le cas de la souche que nous avons utilisée (fig. 3). Les temps de division sont respectivement de :

Milieu de base + Tween 80, 1 p. 100	19 heures.
Milieu de base + Tween 80, 0,5 p. 100	19 —
Milieu de base + Tween 80, 0,2 p. 100	24 —
Milieu de base + Tween 80, 0,1 p. 100	29 —
Milieu de base + Tween 80, 0,05 p. 100	39 —
Milieu de base + Tween 80, 0,02 p. 100	64 —
Milieu de base + Tween 80, 0,01 p. 100	
Milieu de base + glycérine, 5 p. 100	22 heures.
Milieu de base + glycérine, 2 p. 100	22 —
Milieu de base + glycérine, 1 p. 100	33 —
Milieu de base + glycérine, 0,5 p. 100	43 —
Milieu de base + glycérine, 0,2 p. 100	50 —
Milieu de base + glycérine, 0,1 p. 100	62 —
Milieu de base + glycérine, 5 p. 100 + Tween 80, 1 p. 100	44 —

L'examen des courbes de croissance (fig. 1) du B. K. sur Sauton seul (milieu de base contenant comme seule source de carbone 5 p. 100

(1) Les cultures sur milieu au Tween sont également agitées. Les torsades qui se forment dans ces conditions [3] sont dispersées en pipettant à plusieurs reprises avant de faire le prélèvement.

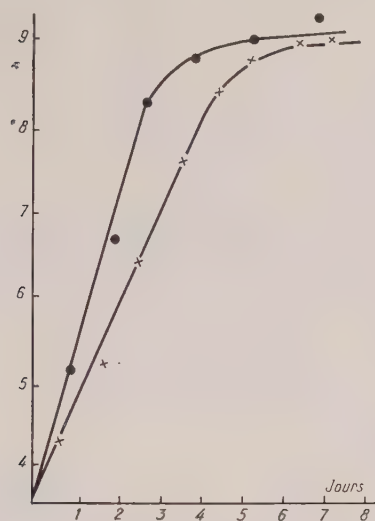


FIG. 1. — Courbes de croissance du B. K. (souche aviaire 923) sur : ●, Sauton + Tween 80 (1 p. 100); x, Sauton seul.

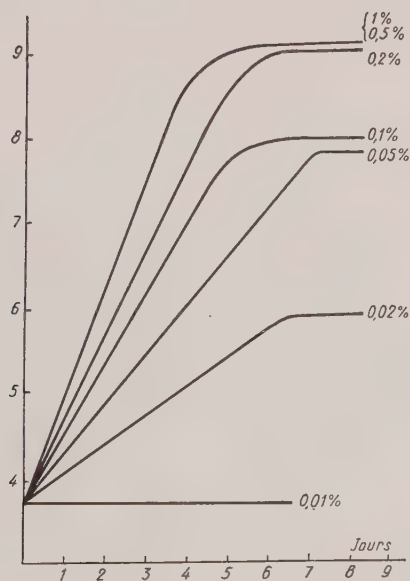


FIG. 2. — Courbes de croissance du B. K. (souche aviaire 923) sur milieu de base contenant du Tween 80 comme seule source de carbone.

de glycérine) et sur Sauton-Tween (sources de carbone : glycérine, 5 p. 100 + Tween 80, 1 p. 100) montre qu'il n'y a pas de diauxie [7]. Les bactéries utilisent donc simultanément, et vraisemblablement au moyen de systèmes enzymatiques différents, ces deux sources de carbone : c'est ce qu'avait déjà montré Monod pour *E. coli* et *B. subtilis* croissant sur certains mélanges de sucres.

Il nous semble donc que l'on peut expliquer la plus grande vitesse de croissance du B. K. sur les milieux au Tween par la seule utilisation de cette substance comme source de carbone (et éventuellement de la sérum-albumine que contiennent ces milieux [5]), sans faire intervenir

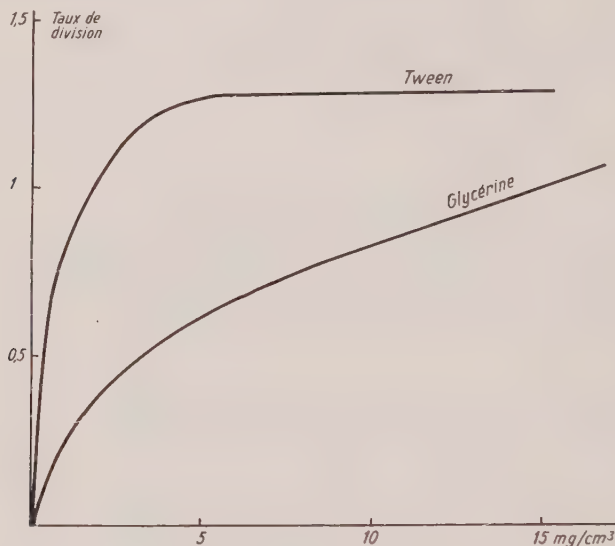


FIG. 3. — Taux de division
en fonction de la concentration de la source de carbone.

une modification de la perméabilité des bactéries par adsorption de l'agent tensioactif. Il est d'ailleurs possible qu'une plus grande vitesse de croissance, c'est-à-dire une modification du rythme ou du type des réactions métaboliques, permette d'expliquer les variations en plus ou en moins de la sensibilité du B. K. à de nombreuses substances antibactériennes [8], les différences de réactions enzymatiques [9] ou de la pathogénicité du B. K. cultivé sur des milieux avec ou sans Tween.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. J. DUBOS et G. MIDDLEBROOK. *Am. Rev. Tuberc.*, 1947, **56**, 334.
- [2] S. IMELIK et J. BRETEY. *Ces Annales*, 1949, **77**, 596.
- [3] D. LUZZATI (sous presse).
- [4] D. LUZZATI. *Ces Annales*, 1952, **82**, 744.

- [5] N. B. HOLMGREN et G. P. YOUMANS, *Am. Rev. Tuberc.*, 1952, 416.
 [6] W. SCHAEFFER, *J. exp. Med.*, 1952, 96, 207.
 [7] J. MONOD, *Recherches sur la croissance des cultures microbiennes*, Hermann édit., Paris, 1942.
 [8] D. LUZZATI, *Thèse Médecine*, Paris, 1952.
 [9] H. BLOCH, *Am. Rev. Tuberc.*, 1950, 62, 270.

LA FICHE RÉTICULO-ENDOTHÉLIALE.

V. QUELQUES REMARQUES TECHNIQUES ET LES PARAMÈTRES DU SÉRUM NORMAL

par G. SANDOR et M^{lle} Y. LE BOT.

(*Institut Pasteur, Service de Chimie Physique.*)

Dans une communication antérieure [1] nous avons donné quelques indications préliminaires concernant les paramètres du sérum humain normal définis par la méthode néphélométrique d'Adner [2] et de Vargues [3], mais nous avons dit que, basées sur un nombre d'observations insuffisant, ces données pourraient être encore modifiées. Etant donné l'importance que présente pour le clinicien la définition des limites des variations physiologiques, nous nous sommes efforcés depuis d'établir celles-ci sur des bases sûres. Les paramètres que nous indiquons ci-dessous ont été obtenus par l'étude de 16 sérums normaux et confirmés indirectement par une centaine de sérums pathologiques, dont les déplacements par rapport à la normale ainsi définie ont été parfaitement rationnels du point de vue physio-pathologique.

Dans la figure ci-jointe nous reproduisons sur la surface : (Eu./Eu. totales).100 $\equiv$ F(pH), la bandelette dans laquelle tombent les données concernant les 16 sérums normaux. Un peu à l'intérieur de cette bandelette nous en avons tracé intuitivement en traits pleins une autre, qui n'a été dépassée que très partiellement par l'un quelconque des sérums normaux pris individuellement. Nous pouvons admettre que cette dernière représente, aux erreurs expérimentales près, les limites réelles des variations physiologiques qui se lisent sur la figure comme suit :

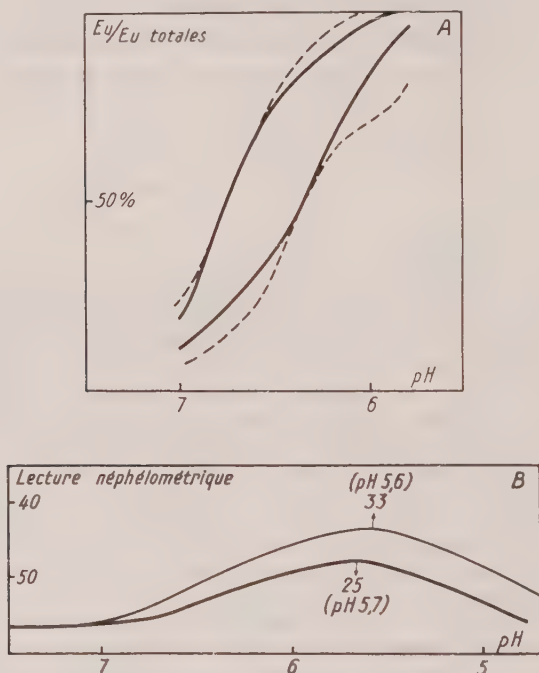
pH	7	6,8	6,6	6,2	6	5,8
Eu/Eu totales p. 100 . .	13-19	20-45	30-70	67-92	85-97	97-100

(c'est-à-dire qu'à pH 7 précipitent au moins 13 et au maximum 19 p. 100 des euglobulines totales et ainsi de suite).

Les maxima des lectures néphélométriques ont varié entre 26 et 33 pour les 16 sérums normaux (1). Ces variations sont relativement très

(1) Rappelons que les lectures sont faites dans le comparateur photo-électrique de Bonét-Mauray à 430 millimicrons [1].

restreintes. On pourrait donc bien tracer, comme le font Adner [2] et Vargues [3], la référence : sérum normal, avec les valeurs directes des lectures néphélométriques. Cependant, nous conseillons la représentation proportionnelle. Tout d'abord, celle-ci seule indique clairement la donnée physio-pathologique fondamentale qui découle des déplacements par rapport à la normale vers la région acide ou vers la région alcaline [4]. D'autre part, les valeurs des lectures néphélométriques varient d'un instant à l'autre après l'établissement des mélanges. Si



A, représentation proportionnelle. 16 sérums normaux;
B, lectures néphélométriques directes : sérums normaux.

les modifications avec le temps sont relativement faibles pour le sérum normal, pour certains sérums pathologiques elles peuvent être très intenses. Par contre, les données évoluent à peu près proportionnellement pour les différents mélanges et, par conséquent, les variations ne se répercutent que très peu dans l'expression proportionnelle. On indiquera à côté du diagramme ainsi défini, la valeur de la lecture néphélométrique maximum.

Quant à la technique employée, les volumes d'acide indiqués dans notre publication antérieure ne sont pas toujours suffisants. Nous utilisons actuellement les volumes suivants, avec lesquels nous avons obtenu déjà, pour plus de 100 sérums, des résultats convenables :

	NUMÉRO DE LA FIOLE									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HCl N/80 (ml) .	0	0,7	1	1,3	1,5	1,66	1,72	1,78	1,84	1,90

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SANDOR et M^{lle} LE BOT. *Ces Annales*, 1953, **84**, 392.
 [2] ADNER. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis*, 1952, **56**, 241.
 [3] VARGUES. *Algérie médicale*, 1952, 99.
 [4] SANDOR et WEILL-FAGE. *Ces Annales*, 1950, **79**, 130.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Isolement d'un virus encéphalomyélique à Brazzaville.

II. — Etude immunologique par les tests de séro-neutralisation croisée. III. — Etude immunologique par les épreuves de fixation croisée du complément. IV. — Culture sur œuf embryonné et conclusions, par A. PELLISSIER.

Du comportement des cobayes tuberculeux traités par l'INH à l'égard de la sensibilisation tuberculinique et de la surinfection, par P. GASTINEL, R. GALLAND et J. MAILLET.

Fiche réticulo-endothéliale. IV. — Relation entre la fiche réticulo-endothéliale et l'électrophorèse. Le fondement d'un diagnostic humoral objectif, par G. SANDOR, LAGRUE et M^{lles} J. LE BOT et J. SABETAY.

Les hémagglutinogènes et les hémagglutinines des sangs de vipères. I. — *Vipera aspis*, par A. EYQUIEM et J. FINE.

Sur la résistance à la peste de certaines espèces de rongeurs sauvages. I. — Faits observés dans la nature, par M. BALTAZARD, B. SEYDIAN, C. MOFIDI, M. BAHMANYAR et R. POURNAKI.

LIVRES REÇUS

G. E. W. Wolstenholme. — *Ciba Foundation. Colloquia on Endocrinology.* Vol. V. *Bioassay of anterior pituitary and adrenocortical hormones.* 1 vol., 228 p., J. et A. Churchill édit., Londres, 1953. Prix : 25 sh.

Comme les quatre précédents, ce volume contient les communications présentées à ce Colloque par différents auteurs, accompagnées des discussions qui les ont suivies. Il se divise en six parties. I. Principes généraux (conditions du dosage biologique des hormones endocriniennes en général). II. L'hormone thyroïdienne (dosage sur le rat et sur le poulet au moyen du ^{32}P et du ^{131}I). III. Gonadotrophines et prolactine (action des gonadotrophines sur le rat hypophysectomisé ; chromatographie ; usage clinique ; dosage de la prolactine sur le poulet et dans l'urine). IV. Hormone de croissance. V. Hormone adrénocorticotrope (dosage de l'ACTH sans hypophysectomie ; mesure de l'activité de l'ACTH dans le plasma). VI. Hormones adrénocorticales (les divers indices de l'activité adrénocorticale ; action des stéroïdes sur le travail musculaire ; dosage comparé des stéroïdes de la corticosurrénale ; dosage des gluco-corticoïdes ; chromatographie). Comme les précédents volumes également, l'ouvrage est complété par une table analytique, chaque article comportant sa bibliographie.

H. T.

Metabolism and function in nervous tissue. Biochemical Society Symposia n° 8. 1 vol., 102 p., Cambridge University Press, Londres, 1952. Prix : 12 sh. 6 d.

Communications présentées au Symposium de la Société de Biochimie, organisé par la London School of Hygiene and Tropical Medicine, le 10 novembre 1951. Le volume comprend les articles suivants, chacun d'eux complété par sa bibliographie : *Le métabolisme des glucides dans le système nerveux*, par R. V. Coxon. *L'acide glutamique et ses rapports avec le système nerveux*, par H. Weil-Malherbe. *Phosphates et nucléotides du système nerveux central*, par H. McIlwain. *Les lipides du S. N. C.*, par G. H. Sloane-Stanley. *Métabolisme du cerveau et fonction cérébrale*, par D. Richter. *Les aspects biochimiques du transport des ions*, par R. E. Davies et H. A. Krebs. *L'emploi des isotopes dans l'étude du métabolisme du système nerveux*, par R. M. C. Dawson.

H. T.

H. Barcroft et H. J. C. Swan. — *Sympathetic control of human blood vessels.* 1 vol., 165 p. Edward Arnold édit., Londres, 1953. Prix : 18 sh.

Ce livre, premier volume de la série des Monographies de la Physiological Society, étudie d'abord l'action des nerfs vaso-constricteurs et vaso-dilatateurs sur les muscles, et également l'action des hormones (adrénaline, noradrénaline) qui jouent un rôle dans la circulation

sanguine des muscles et de la peau, ou dans la circulation générale. D'autres chapitres sont consacrés aux agents bloquant l'action des hormones, aux tumeurs de la partie médullaire de la surrénale et aux techniques de pléthysmographie. Il comprend une table analytique assez complète, qui permet de se reporter facilement au sujet étudié.

H. T.

C. H. Stuart-Harris. — *Influenza and other virus infections of the respiratory tract.* 1 vol., 235 p., 98 fig., Edward Arnold édit., Londres, 1953. Prix : 30 sh.

Après un premier chapitre traitant de la classification des virus des voies respiratoires, cinq autres sont consacrés à la grippe et envisagent tous ses aspects cliniques et épidémiologiques : tableau clinique, complications, histologie pathologique, etc. Les techniques de laboratoire (culture du virus sur l'œuf, réactions sérologiques, recherche des anticorps) font l'objet du chapitre suivant. Les huit derniers étudient les diverses autres maladies de l'appareil pulmonaire : pneumonie atypique, psittacose, ornithose, fièvre Q, rhume banal, leur prophylaxie et leur traitement, ainsi que la vaccination contre la grippe.

H. T.

Actualités pharmacologiques, publiées sous la direction de **R. Hazard**. 5^e série. 1 vol. 272 p., 47 fig., 51 tableaux. Masson et C^o édit., Paris, 1952. Prix : 2.000 francs.

Depuis 1949, sous l'égide de la Chaire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris, des pharmacologistes, des physiologistes, des chimistes, français ou étrangers de langue ou d'affinité française, viennent chaque année exposer en une série de conférences les sujets dans lesquels ils sont spécialisés. Ils en font l'historique et présentent en même temps les références bibliographiques et l'interprétation générale. Ces conférences sont ensuite éditées sous la direction du professeur Hazard. Le présent volume en constitue la cinquième série. Il contient les articles suivants : *Acquisitions récentes concernant les anthelminthiques et leur étude pharmacodynamique*, par R. Cavier ; *Formes d'élimination urinaire des hormones cortico-surréaliennes*, par J. Cheymol et Robert-Henry ; *Mécanisme d'action des médicaments diurétiques*, par J. M. de Corral ; *Le rôle des chimiorécepteurs en pharmacologie et en physiologie*, par C. Heymans ; *Relations entre la structure des molécules et leur activité spasmolytique*, par J. Levy et B. Tchoubar ; *Orientation pharmacologique des recherches modernes sur le diabète sucré*, par A. Loubatières ; *Tendances actuelles des recherches de la chimiothérapie des états cancéreux*, par R. Truhaut. Une importante bibliographie accompagne chacun de ces articles.

H. T.

C. H. Gray. — *The bile pigments.* 1 vol., 142 p. Methuen and C^o édit., Londres 1953. Prix : 9 sh. 6 d.

Ce petit livre représente le troisième volume d'une nouvelle série de monographies (semblable à la série déjà publiée par le même

éditeur sur des questions de physique). Il ne prétend pas remplacer les ouvrages beaucoup plus importants qui ont été déjà consacrés à la question des pigments biliaires par des auteurs compétents, mais c'est une mise au point très récente de la question. Il traite surtout des pigments biliaires chez l'homme et s'adresse, par conséquent, aux anatomo-pathologistes, aux biochimistes, aux physiologistes et aux cliniciens. En appendice sont traitées les techniques de la préparation des pigments biliaires et leur dosage qualitatif et quantitatif dans l'urine.

H. T.

Deuxième rapport du Comité d'experts pour la Formation professionnelle et technique du Personnel médical et auxiliaire. — *Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*. N° 69, 27 p. Prix : Fr. fr., 65 ; Fr. s., 0,80 ; 1 sh. 6 d ; doll., 0,20.

Selon les vues exprimées dans ce rapport, l'enseignement médical devrait viser avant tout à donner aux étudiants une formation de base qui leur permette ensuite de poursuivre leur formation dans diverses branches de la médecine, dont la médecine générale est la plus importante. Les études médicales, préparées elles-mêmes par l'enseignement des humanités, des sciences biologiques et des sciences du comportement, devraient avoir pour objet l'homme dans son intégralité, soumis à l'influence du milieu physique et des conditions psychologiques, familiales et sociales dans lesquelles il évolue. Il est éminemment souhaitable que l'étudiant soit mis en contact dès le début de ses études avec les patients considérés non seulement comme des cas cliniques, mais dans l'ensemble de leurs conditions de vie. Une large place devrait donc être faite, dès le début des études, à la médecine préventive et à la médecine sociale. L'application pratique de ces principes, leurs répercussions sur l'organisation des études sont envisagées dans le rapport, ainsi que les divers éléments dont dépend leur succès : la préparation et la sélection des étudiants, le rôle et la qualification du personnel enseignant, les normes de l'enseignement, la collaboration entre les pays des diverses parties du monde.

H. T.

AVIS

Les V^{es} JOURNÉES DE PATHOLOGIE COMPARÉE DE LANGUE FRANÇAISE se tiendront à Strasbourg, les 2, 3 et 4 octobre 1953. Pour tous renseignements, s'adresser au Secrétariat Général, 7, rue Gustave-Nadaud, Paris-16^e.

Le Gérant : G. MASSON.